



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**  
**Facultad de Química e Ingeniería Química**  
**Escuela Profesional de Química**

**Aislamiento y elucidación estructural de los  
metabolitos bioactivos del liquen *Usnea aurantiacoatra*  
y su actividad antibacteriana**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Química

**AUTOR**

Narda Jovan VELASCO SALAZAR

**ASESOR**

Dr. Olivio Nino CASTRO MANDUJANO

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Velasco, N. (2020). *Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos bioactivos del liquen Usnea aurantiacoatra y su actividad antibacteriana*. Tesis para optar el título de Química. Escuela Profesional de Química, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	<a href="https://orcid.org/0000-0002-2904-4256">https://orcid.org/0000-0002-2904-4256</a>
DNI o pasaporte del autor	74440874
Código ORCID del asesor	<a href="https://orcid.org/0000-0002-6592-6934">https://orcid.org/0000-0002-6592-6934</a>
DNI o pasaporte del asesor	07683880
Grupo de investigación	PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA
Agencia financiadora	<p><b>País de la agencia financiadora</b> Perú</p> <p><b>Nombre y siglas de la agencia financiadora</b> Dirección de Asuntos Antárticos del Ministerio de Relaciones Exteriores del Perú (MRE)</p> <p><b>Nombre del programa financiero</b> ANTAR XXV</p> <p><b>Número de contrato</b> NO hay número de contrato</p>
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<p><b>Lugar</b> Instituto Tecnológico de la Producción – ITP cite pesquero Perú, Callao, Callao, Callao, Calle Santa Cruz 07046.</p> <p><b>Coordenadas geográficas</b> Latitud: -11.989382 Longitud: -77.127643</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2019
Disciplinas OCDE	<p>Química orgánica</p> <p><a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.01">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.01</a></p>



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA**

Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209  
Ciudad Universitaria – Calle Germán Amezaga 375 – Lima 1  
“Año de la Universalización de la Salud”

**ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA**

## **ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los suscritos miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Química, bajo la Presidencia del **Quím. Marco Vicente Guerrero Aquino** (Presidente), la **Dra. Melissa Rabanal Atalaya** (Miembro) la **Mg. María Rosario Calixto Cotos** y el **Dr. Olivio Nino Castro Mandujano** (Asesor), habiendo presentado para tal efecto la **TESIS**, titulada **“AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS METABOLITOS BIOACTIVOS DEL LIQUEN USNEA AURANTIACO-ATRA Y SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA”** después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la **TESIS** elaborado por la Bachiller en Química: **Narda Jovan Velasco Salazar**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL de QUÍMICA**, acordaron calificarlo con la **NOTA** de:

**DIECINUEVE**

**19**

.....  
(LETRA)

.....  
(NÚMERO)

Ciudad Universitaria, 24 de noviembre de 2020.

  
**Dra. MELISSA RABANAL ATALAYA**  
MIEMBRO

  
**Quím. MARCO VICENTE GUERRERO AQUINO**  
PRESIDENTE

  
**Mg. MARIA ROSARIO CALIXTO COTOS**  
MIEMBRO

  
**Dr. OLIVIO NINO CASTRO MANDUJANO**  
ASESOR



**UNMSM**

Firmado digitalmente por LINARES  
FUENTES Thais Cleofe FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 31.12.2020 15:29:45 -05:00

**THAIS CLEOFÉ LINARES FUENTES**  
Directora (e) de la E.P. de Química

## **DEDICATORIA**

A mi madre, Gloria Salazar Cruzatt, por enseñarme el camino correcto, su continua comprensión, apoyo incondicional y ser mi motivación.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo lo que ha hecho en mi vida, acompañarme y darme la fortaleza de seguir.

A mi querida Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por haberme formado profesionalmente y permitido tener las experiencias más gratas de mi vida, por enseñarme que los sueños se concretan si hay perseverancia.

Al Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), por darme la oportunidad del desarrollo del proyecto de tesis.

A la Dirección de Asuntos Antárticos del Ministerio de Relaciones Exteriores del Perú por aprobar el proyecto de investigación “Actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatorio y anti-quorum sensing de macroalgas y líquenes provenientes de la estación Machu Picchu (Isla Rey Jorge - Antártida) en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos” al desarrollarse en el ANTAR XXV; la presente tesis forma parte del mencionado proyecto.

A la Universidad de Chile, Laboratorio de Productos Naturales Extremos a cargo del Dr. Carlos Areche, quien me permitió realizar la parte instrumental de esta investigación, de mi consideración especial por su interés, apoyo y conocimiento brindado.

Al Blgo. Ángel Ramírez, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por la identificación de la muestra liquénica.

Infinitamente a mi profesora Quím. Juana Huamán Malla, por todo su cariño, paciencia y haberme transmitido su experiencia, conocimientos, consejos y darme las bases de la investigación científica.

A mi asesor Dr. Nino Castro Mandujano, quien me transmitió sus conocimientos, experiencia y fue mi guía principal en esta investigación, gracias por su paciencia, dedicación y ayuda constante.

A mi co-asesor Mg. Pablo Londoño y a Mg. Claudia Robinet, por facilitar las muestras, los materiales e insumos para desarrollar la presente tesis y por transmitirme su experiencia y procedimientos que ampliaron mi conocimiento en la microbiología.

A la Mg. Erika Calla, por su tiempo, consejos y por apoyo en la interpretación de espectros RMN  $^1\text{H}$ .

Al Dpto. de Investigación de Síntesis Inorgánica, en especial a la Quím. María Lino, por su colaboración.

Al Decano, Dr. Cecilio Garrido Schaeffer por su apoyo y empatía, también a mis profesores de la FQIQ porque me transmitieron sus conocimientos, el amor por la química y por la formación que me brindaron, de mi consideración especial al Dr. Julio Santiago y la Srta. Marlene Velásquez, por haber contribuido y apoyado para el desarrollo experimental de mi tesis.

A mis padres por el apoyo que me brindaron en cada etapa de mi vida.

A Don Marcial Cárdenas Vega, quien fue un apoyo muy grande para mi familia, agradecida con usted por confiar y creer en mí, hoy ya está en el cielo.

A Oscar Godiño por estar presente, por tu cariño, apoyo y comprensión.

A mis queridos amigos: Nick Marallano, Juan Daniel Gutarra, Gian Carlos Vergaray, Eleazar Castro, Liset Linares, gracias por brindarme su apoyo, fortaleza cuando más lo necesitaba y el cariño incomparable que valoro tanto, también a Carmen Benites, mi compañera de tesis, con quien compartí este camino gracias por tu amistad, empatía y complicidad.

Siempre agradecida porque ustedes forman parte de mi vida, porque Dios lo permitió así, y para todos los que contribuyeron con mi desarrollo profesional, para ustedes: Muchas gracias.



## RESUMEN

El presente trabajo describe el aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios, que presentan actividad antibacteriana, de los extractos del líquen *Usnea aurantiaco-atra* recolectado en la estación científica Machu Picchu, Isla Rey Jorge - Antártida.

A partir de 600 g de muestra limpia y seca se realizaron extracciones consecutivas con los solventes diclorometano, acetona y metanol a temperatura ambiente, obteniéndose tres extractos iniciales, a los cuales se les realizaron las separaciones y purificaciones mediante técnicas cromatográficas en capa delgada y columna, obteniéndose cada vez sustancias de mayor pureza. Para los extractos iniciales y a todos los extractos provenientes del fraccionamiento se realizaron ensayos de evaluación de actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* empleando el método de difusión de discos, aquellas fracciones que mostraron actividad pasaron a las fases de purificación y posterior elucidación mediante técnicas espectroscópicas RMN  $^1\text{H}$ , UV e IR.

Se elucidaron los siguientes compuestos: (+) R-ácido úsnico (C1), peróxido de ergosterol (C2) y tentativamente el ácido 2,3,5-trihidroxitereftálico (3.2 b). Según los resultados los compuestos C1 y 3.2 b, pueden ser considerados como potenciales bioactivos frente a *S. aureus*, debido a que muestran actividad a concentraciones muy bajas (alrededor de 3,8  $\mu\text{g}$ ) y presentan los porcentajes de inhibición más altos, mientras que, el compuesto C2 también podría ser considerado, pero a partir de concentraciones de 25  $\mu\text{g}$ .

Palabras claves: *U. aurantiaco-atra*, actividad antibacteriana, compuestos bioactivos.

## ABSTRACT

The present research describes the isolation and structural elucidation of secondary metabolites, which show antibacterial activity, from the extracts of the lichen *Usnea aurantiaco-atra* collected at the Machu Picchu scientific station, King George Island-Antarctica.

From 600 g of clean and dry sample, consecutive extractions were carried out with the solvents dichloromethane, acetone and methanol at room temperature, obtaining three initial extracts, from which the separations and purifications were carried out by means of thin layer and column chromatographic techniques, obtaining increasingly purity substances. For the initial extracts and all the extracts from the fractionation, antibacterial activity evaluation tests against *Staphylococcus aureus* were carried out using the disk diffusion method, those fractions that showed activity passed to the purification and subsequent elucidation phases using  $^1\text{H}$  NMR, UV and IR spectroscopic techniques.

Were elucidated: (+) R-usnic acid (C1), ergosterol peroxide (C2) and tentatively 2,3,5-trihydroxyterephthalic acid (3.2 b). According to the results, compounds C1 and 3.2 b can be considered as potential bioactive against *S. aureus*, because they show activity at very low concentrations (around 3,8  $\mu\text{g}$ ) and present the highest percentages of inhibition, while the compound C2 could also be considered, but from concentrations of 25  $\mu\text{g}$ .

Key words: *U. aurantiaco-atra*, antibacterial activity, bioactive compounds.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Índice de figuras.....</b>	<b>x</b>
<b>Índice de tablas.....</b>	<b>xii</b>
<b>Índice de anexos .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>xv</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
1.1.    Justificación del trabajo .....	2
1.2.    Objetivos .....	3
1.2.1.    Objetivo General .....	3
1.2.2.    Objetivos Específicos.....	3
1.3.    Hipótesis .....	4
1.4.    Antecedentes .....	4
<b>CAPÍTULO II: PARTE TEÓRICA.....</b>	<b>7</b>
2.1.    Líquenes.....	7
2.2.    Compuestos liquénicos .....	7
2.3.    Rutas biosintéticas .....	11
2.3.1.    Ruta del acetil polimalonil .....	11
2.3.2.    Ruta del ácido mevalónico .....	11
2.3.3.    Ruta del ácido shikímico .....	12
2.4.    Género <i>Usnea</i> .....	15
2.4.1.    Descripción taxonómica.....	16
2.4.2.    Características químicas.....	16
2.5. <i>Usnea aurantiaco-atra</i> .....	17
2.5.1.    Taxonomía y características botánicas.....	17

2.6.	Usos y aplicaciones de los líquenes .....	19
2.7.	Actividad antibacteriana en los líquenes.....	20
2.7.1.	Método de Kirbi Bauer.....	21
2.7.2.	Medición de halos de inhibición .....	22
2.8.	Resistencia a los antibióticos .....	23
2.8.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA .....</b>		<b>26</b>
3.1.	Materiales, Reactivos y equipos .....	26
3.1.1.	Materiales .....	26
3.1.2.	Reactivos .....	26
3.1.3.	Equipos.....	27
3.2.	Análisis preliminar.....	27
3.2.1.	Recolección .....	27
3.2.2.	Secado y molienda .....	28
3.3.	Marcha fitoquímica.....	28
3.3.1.	Identificación de alcaloides.....	30
3.3.2.	Identificación de flavonoides .....	31
3.3.3.	Identificación de quinonas – antraquinonas .....	31
3.3.4.	Identificación de taninos .....	32
3.3.5.	Identificación de saponinas .....	32
3.3.6.	Identificación de esteroides.....	33
3.3.7.	Identificación de cumarinas .....	33
3.4.	Aislamiento .....	34
3.4.1.	Extracción sólido – líquido .....	34
3.5.	Separación y purificación .....	35
3.5.1.	Análisis por cromatografía en columna (CC) .....	35
3.6.	Actividad antibacteriana .....	41
3.6.1.	Microorganismo de prueba.....	42

3.6.2. Preparación de los medios de cultivo .....	42
3.6.2.1. Agar Müller-Hinton (MH) .....	42
3.6.3. Preparación de extractos.....	42
3.6.4. Inoculación .....	43
3.6.4.1. Preparación del inóculo .....	43
3.6.4.2. Inoculación de las placas.....	44
3.6.5. Ensayo de actividad antibacteriana .....	44
3.7. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	45
3.8. Análisis por Espectrofotometría Ultravioleta – Visible (UV-VIS).....	45
3.9. Análisis por Espectrometría Infrarroja (IR).....	45
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1. Aislamiento .....	47
4.2. Separación y purificación .....	47
4.3. Marcha fitoquímica.....	48
4.4. Actividad antibacteriana .....	52
4.4.1. Evaluación antibacteriana del compuesto C1.....	52
4.4.2. Evaluación antibacteriana del compuesto C2.....	54
4.4.3. Evaluación antibacteriana del compuesto 3.2 b .....	56
4.5. Elucidación estructural.....	60
4.5.1. Elucidación de la estructura del compuesto C1 .....	61
4.5.2. Elucidación de la estructura del compuesto C2 .....	65
4.5.3. Elucidación de la estructura del compuesto 3.2 b .....	70
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>76</b>
5.1. Conclusiones .....	76
5.2. Recomendaciones .....	77
<b>CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>78</b>

<b>CAPÍTULO VII: ANEXOS .....</b>	<b>85</b>
-----------------------------------	-----------

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Especie <i>U. aurantiaco-atra</i> .	19
<b>Figura 2.</b> Modo de medición del halo de inhibición.	23
<b>Figura 3.</b> Marcha fitoquímica de la muestra seca y molida <i>U. aurantiaco-atra</i> .	29
<b>Figura 4.</b> Separación sucesiva por solvente.	35
<b>Figura 5.</b> Separación del extracto ED.	38
<b>Figura 6.</b> Separación del extracto EA.	40
<b>Figura 7.</b> Separación del extracto EM.	41
<b>Figura 8.</b> Identificación de compuestos fenólicos.	51
<b>Figura 9.</b> Identificación de saponinas terpénicas y esteroidales	51
<b>Figura 10.</b> Identificación de Esteroles por CCD.	51
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de inhibición de los compuestos elucidados.	60
<b>Figura 12.</b> Espectro UV del extracto clorofórmico del compuesto C1.	61
<b>Figura 13.</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ del compuesto C1 en $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz.	63
<b>Figura 14.</b> Estructura química propuesta para el compuesto C1.	65
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas A y B del compuesto C2, expuesto a la luz UV y visible.	66
<b>Figura 16.</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ del compuesto C2 en $\text{CD}_3\text{DO}$ a 400 MHz.	66
<b>Figura 17.</b> Ampliación I del espectro RMN $^1\text{H}$ del compuesto C2.	67
<b>Figura 18.</b> Ampliación II, señal multiplete del espectro RMN $^1\text{H}$ .	68
<b>Figura 19.</b> Ampliación III, señal de metilos en el espectro RMN $^1\text{H}$ .	68
<b>Figura 20.</b> Estructura química propuesta para el compuesto C2.	70
<b>Figura 21.</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ del compuesto 3.2 b en $\text{CD}_3\text{OD}$ a 400 MHz.	71

<b>Figura 22.</b> Espectro IR (KBr) del compuesto 3.2 b. ....	73
<b>Figura 23.</b> Estructura química propuesta para el compuesto 3.2 b. ....	75



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Compuestos reportados de especies liquénicas.....	9
<b>Tabla 2.</b> Compuestos reportados de especies liquénicas.....	10
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de compuestos liquénicos según la ruta del acetil polimalonil.....	13
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de compuestos liquénicos según la ruta del acetil polimalonil.....	14
<b>Tabla 5.</b> Clasificación de compuestos liquénicos según la ruta del ácido mevalónico.....	14
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de compuestos liquénicos según la ruta del ácido shikímico.....	15
<b>Tabla 7.</b> Relación en volumen para cada sistema de elución empleado en CC .....	36
<b>Tabla 8.</b> Datos experimentales de los extractos aislados. ....	47
<b>Tabla 9.</b> Datos experimentales de los compuestos puros.....	47
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la marcha fitoquímica de la muestra sólida molida del liquen. ....	50
<b>Tabla 11.</b> Resultados de la prueba de AA del compuesto C1 frente a <i>S. aureus</i> . ....	53
<b>Tabla 12.</b> Resultados de la prueba de AA de la fracción ED 9 frente a <i>S. aureus</i> . ....	53
<b>Tabla 13.</b> Relación entre la AA y % de inhibición para el compuesto C1 y fracción ED 9. ....	54
<b>Tabla 14.</b> Resultados de la prueba de AA del compuesto C2 frente a <i>S. aureus</i> . ....	55
<b>Tabla 15.</b> Resultados de la prueba de AA del extracto EA 1 frente a <i>S. aureus</i> .....	55
<b>Tabla 16.</b> Resultados de la AA y % de inhibición para el compuesto C2 y fracción EA 1. ....	56
<b>Tabla 17.</b> Resultados de la prueba de AA del compuesto 3.2 b frente a <i>S. aureus</i> .....	58
<b>Tabla 18.</b> Resultados de la prueba de AA de la subfracción A frente a <i>S. aureus</i> .....	58
<b>Tabla 19.</b> Resultados de la AA y % de inhibición para el compuesto 3.2 b y subfracción A.....	59
<b>Tabla 20.</b> Comparación del espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto C1 y del ácido úsnico.....	64
<b>Tabla 21.</b> Comparación del espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto C2 y del peróxido de ergosterol. ....	69

<b>Tabla 22.</b> Desplazamiento químico del compuesto 3.2 b .....	72
<b>Tabla 23.</b> Región de frecuencia y características para el espectro IR del compuesto 3.2 b.....	74

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Técnicas de extracción sólido - líquido .....	85
<b>Anexo 2.</b> Evaluación de la actividad antibacteriana.....	86
<b>Anexo 3.</b> Puntos de corte de los discos de antibióticos empleados como control positivo.....	86

**Lista de abreviaturas**

AA	Actividad antibacteriana
ATCC	the American Type Culture Collection
°C	Grados Celsius
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CLSI	Instituto de estándares para el laboratorio clínico
CC S	Cromatografía en columna – Sephadex
cm	Centímetro
C (+)	Control positivo
C (-)	Control negativo
d	Doblete
dd	Doblete de doblete
EA	Extracto acetónico
ED	Extracto diclorometánico
ED 9	Extracto diclorometánico fracción 9
EM	Extracto metanólico
EP	Éter de petróleo
Estir.	Estiramiento
EUCAST	European Comité on Antimicrobial Susceptibility Testing

g	Gramo
H	Protón, hidrógeno
HPLC	High performance liquid chromatography
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
ITP	Instituto Tecnológico de la Producción
L	Litro
Me	Metilo
m	Multiplete
mL	Mililitro
mg	Miligramo
mm	Milímetro
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MH	Müeller Hinton
NPH	No presenta halo de inhibición
O	Oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
pp	Precipitado
Rf	Factor de retención
RMN $^1\text{H}$	Resonancia Magnética Nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sol.	Solución
TMP	Trimetoprima
<i>U. antarctica</i>	<i>Usnea antarctica</i>
<i>U. aurantiaco-atra</i>	<i>Usnea aurantiaco-atra</i>
<i>U. durietzii</i>	<i>Usnea durietzii</i>
UV	Ultravioleta
µg	microgramo
δ	Desplazamiento químico

## CAPÍTULO I

En el nuevo siglo la demanda de los productos naturales en la industria médico-farmacéutica ha crecido vertiginosamente y ha alcanzado un gran desarrollo debido a los estudios multidisciplinarios entre los campos de la medicina, biología y química, es así que una de las metas más importante de las ciencias médicas y farmacéuticas se han orientado a la búsqueda de moléculas farmacológicamente activas provenientes de especies como bacterias, plantas, hongos, algas y líquenes, entre otros (Calla, 2019; Perico, 2011). En la Antártida existen cerca de 200 especies de líquenes, no obstante, el continente antártico sigue siendo inexplorado en comparación con los territorios terrestres, lo que indica que hay mayor probabilidad de encontrar nuevos productos naturales (Viteri, 2015).

Los líquenes son considerados organismos interesantes por su naturaleza única, se clasifican en el reino fungi, es decir son un grupo de hongos que han adoptado exitosamente un modo de vida en simbiosis con organismos fotosintéticos como algas o un tipo especial de bacterias fotosintéticas. Los líquenes son quizás los mejores vegetales adaptados en la climatología antártica, sumamente resistentes capaces de sobrevivir en condiciones extremas (Quilhot *et al.*, 1992), estas mismas son las que les han permitido desarrollar mecanismos de defensa para su supervivencia, debido a que son capaces de producir como parte de su metabolismo sustancias químicas llamadas sustancias liquénicas en una alta concentración. De aquí viene el interés de su estudio, en saber cuáles son aquellas sustancias que le otorgan funciones de defensa y a la vez resistencia, sin las cuales muchos organismos no podrían desarrollarse en climas extremos. Por esto se ha recurrido a estudios más profundos en organismos antárticos como los líquenes, y se les

ha relacionado con diversas propiedades como antioxidantes, antibacteriales, citotóxicas, anticancerígenas entre otras (Castro, 2016).

Uno de los principales problemas asociados a múltiples infecciones hospitalarias y comunitarias causadas por *S. aureus* es la aparición de resistencia a los antibióticos de uso común, debido principalmente a su abuso e inadecuada utilización (Cervantes *et al.*, 2014), además de que, en los últimos años la mayoría de fármacos aprobados son nuevas indicaciones de fármacos conocidos o combinaciones de ellos (Jiménez, 2013) . Es por ello la gran preocupación que se ha generado por las bacterias multiresistentes que están poniendo en grave riesgo la salud de la población, generando infecciones cuya mortalidad mundial se acrecienta cada vez más; sin embargo, los ambientes extremos generan una esperanza de nuevos tratamientos para estos patógenos, por sus especiales condiciones han forzado a los organismos que la habitan a generar mecanismos de adaptación, como la producción de compuestos bioactivos, ya que en los líquenes hemos podido encontrar, seres productores de nuevos y prometedores compuestos, en este contexto la antártica tiene mucho que ofrecer y es motivo para el aislamiento y caracterización de compuestos con actividad antibacteriana y obtener nuevas soluciones.

### **1.1. Justificación del trabajo**

Los estudios biológicos y químicos han permitido considerar a la naturaleza como fuente inagotable de compuestos con una gran diversidad y aplicación. En las últimas décadas se ha optado por sustituir sustancias químicas sintéticas como antibióticos por productos naturales como nueva alternativa. Por ello, este estudio busca encontrar compuestos con actividad antibacteriana en la especie *U. aurantiaco-atra*, debido a que es de suma importancia descubrir nuevas



alternativas con nuevos mecanismos de respuesta, más eficaces, más selectivos, de menor toxicidad y riesgo que puedan solucionar el problema de resistencia a los antibióticos de uso común, además por ser el continente antártico considerado inexplorado en comparación con los territorios terrestres, hay mayor probabilidad de encontrar nuevos compuestos farmacológicamente activos en especies como los líquenes.

## **1.2. Objetivos**

### ***1.2.1. Objetivo General***

Determinar estructuralmente la composición química de metabolitos secundarios de los extractos del liquen antártico *U. aurantiaco-atra* de la Isla Rey Jorge-Antártida con altas propiedades antibacterianas.

### ***1.2.2. Objetivos Específicos***

- ✓ Identificar los metabolitos secundarios del liquen *U. aurantiaco-atra* a través de la marcha fitoquímica.
- ✓ Desarrollar las técnicas de separación, purificación e identificación de los metabolitos secundarios.
- ✓ Evaluar la propiedad antibacteriana a los extractos iniciales y de todos los extractos provenientes del fraccionamiento.

- ✓ Determinar la composición química de los metabolitos secundarios mediante técnicas espectroscópicas como IR, RMN  $^1\text{H}$  y UV-visible.

### 1.3. Hipótesis

Será posible aislar y elucidar un metabolito secundario con propiedad antibacteriana del liquen antártico *U. aurantiaco-atra* de la Isla Rey Jorge – Antártida.

### 1.4. Antecedentes

Los líquenes por su gran adaptabilidad al medio han conseguido colonizar muchos hábitats terrestres presentando una distribución mundial desde los polos a las regiones tropicales y desde las llanuras a las montañas más altas y desde los sitios más húmedos como las selvas y los bosques hasta las zonas desérticas (Herrera y Ulloa, 1990).

Vega (2016) afirma: “En la flora de la región antártica los líquenes destacan por su variedad y desarrollo, siendo una fuente potencial de nuevos compuestos bioactivos que se encuentran en los metabolitos secundarios”, estos productos secundarios tendrían un rol adaptativo que se desarrollan en respuesta al clima extremo en donde se desarrollan (Quilhot *et al.*, 1992).

En la Antártida la insolación sería el factor primario, las estrategias adaptativas desarrolladas por estos organismos, conducen a un mejor aprovechamiento de la luz y la protección eficiente para sus pigmentos fotosintéticos. La presencia de metabolitos que funcionen como filtros solares adquiere una particular relevancia en líquenes antárticos, debido a su absorción selectiva de rayos UV que le permite proteger al fotobionte de las radiaciones nocivas, y además la

existencia de compuestos que emitan la energía absorbida, provee de una cuota extra para el trabajo fotosintético, además los productos del metabolismo secundario cumplirían roles de reservas energéticas en situación de estrés nutricional para los líquenes (Quilhot *et al.*, 1992).

Piñeiro *et al.* (2012) identificaron 13 especies, según sus características morfológicas e identificación de sustancias químicas, en torno a las instalaciones de la base científica de la Antártida Artigas, determinando que la *U. aurantiaco-atra* era la especie más abundante y presentó mayor cobertura. Wirtz *et al.* (2012) mencionan que mediante estudios moleculares las especies *Usnea antarctica* y *U. aurantiaco-atra* no pueden ser separadas. Sin embargo, Perez-Ortega *et al.* (2012) han confirmado que la situación es mejor interpretarla como plasticidad fenotípica, referido a que una especie de líquenes puede tener varios fotobiontes.

Vega (2016) realizó la caracterización de las actividades biológicas del liquen antártico *U. aurantiaco-atra*. Los estudios de citotoxicidad realizados han demostrado que el extracto hexánico que contiene ácido úsnico (metabolito mayoritario), ácido linoleico y terpenos, presentan actividad citotóxica frente a líneas celulares de melanoma y queratinocitos. La actividad insecticida de los extractos analizados frente a la mosca de la fruta *Ceratitis capitata*, muestra que el ácido úsnico está relacionado con su mortalidad, aunque los resultados obtenidos con los distintos extractos no pueden considerarse significativos. Además, la actividad antioxidante del extracto metanólico no fue muy elevada y la actividad citotóxica en las líneas celulares ensayadas es baja o nula, estos resultados son similares a los encontrados por García *et al.* (2017a) quienes reportan que los extractos crudos acetona/metanólico de *U. antarctica* y *U. aurantiaco-atra* presentan un potencial antioxidante moderado; así como la actividad citoprotectora es baja al evaluar el extracto crudo acetona/metanólico de *U. antarctica* y *U. aurantiaco-atra*, siendo estos resultados no

significativos posiblemente por haber utilizado extractos crudos en las evaluaciones (García *et al.*, 2017b).

Por otro lado, Londoño *et al.* (2017a) determinaron que los extractos crudos acetona/metanólico de *U. antarctica* y *U. aurantiaco-atra* presentan actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus*, y además presentan actividad anti-inflamatoria evaluada mediante la prueba de estabilidad de membrana celular en glóbulos rojos (Londoño *et al.*, 2017b).

En el Perú se ha realizado escasos estudios fitoquímicos de especies liquénicas, entre éstos se realizó investigaciones en la especie *Usnea durietzii*, de la cual se logró aislar y caracterizar ácido úsnico y ácido salazínico (Zelada *et al.*, 2012).

También se estudiaron una variedad de especies con otras finalidades, entre ellas Castro (2017) aisló y elucidó 5 compuestos liquénicos, entre ellos al ácido úsnico del líquen *Everniopsis trulla* y junto al quitosano aislado a partir de los residuos orgánicos “Pluma de pota” del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtenido de la industria pesquera, se preparó una crema fotoprotectora. Se comprobó su acción regeneradora de piel y el efecto anti-inflamatorio de la crema. Los resultados demuestran que la crema fotoprotectora califica como libre de microorganismos y apto para su uso. Todas estas investigaciones nos muestran que es claro el interés que suscitan los líquenes en todo el mundo, por ser una fuente de compuestos con una importante actividad biológica. La cantidad y variedad de los metabolitos secundarios que presentan, hacen que muchos de ellos sean objeto de estudio, por las posibilidades que ofrecen de encontrar nuevas sustancias que puedan ser de interés, desde el punto de vista de la farmacognosia (Vega, 2016).

## **CAPÍTULO II: PARTE TEÓRICA**

### **2.1. Líquenes**

Los líquenes son seres complejos cuyos cuerpos vegetativos (talos) son el resultado de asociaciones simbióticas entre un hongo heterótrofo (micobionte) y uno o más fotobiontes (alga verde o cianobacteria). Mientras el hongo se encarga del abastecimiento del agua y sales minerales, proteger al alga de las radiaciones directas del sol y absorber trazas minuciosas de contaminantes atmosféricos, también es el responsable de biosintetizar la mayoría de los metabolitos secundarios presentes en el liquen, por su parte el alga sintetiza los azúcares, brinda el alimento y vitaminas necesarias para el metabolismo (Castro, 2004; Albornoz, 2019). Las definiciones modernas consideran a estos organismos como hongos liquenizados (Vaillant, 2014).

Barreno y Pérez (2003) mencionan que “De este estrecho contacto físico, interacción mutualista, se originan los tallos liquénicos estables con morfología, anatomía, fisiología, genética y ecología específica” y diferentes a las que tienen los hongos por separado.

La asociación liquénica conduce a la formación de organismos capaces de prosperar en medios muy diversos de la naturaleza, motivo por el cual su distribución geográfica es muy amplia ya que presenta originalidad adaptativa incluso en condiciones extremas. “Esta asociación llamada liquenización permite colonizar ambientes no asequibles al resto de los hongos o a otros vegetales autótrofos y parece tener un origen muy antiguo” (Barreno y Pérez, 2003).

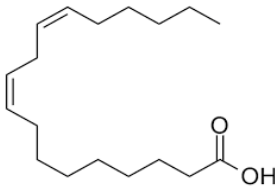
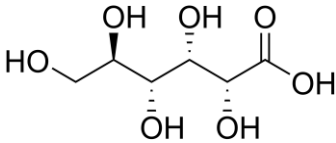
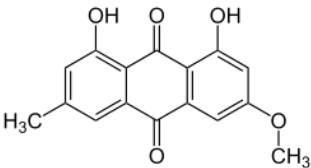
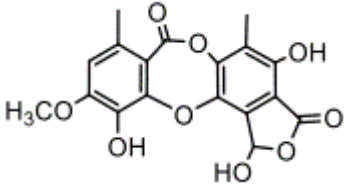
### **2.2. Compuestos liquénicos**

Los líquenes contienen sustancias químicas producto de su metabolismo primario y secundario. La presencia de una variedad de sustancias es una de las características más notables, como consecuencia de la interacción entre un hongo y un alga para formar un talo liquénico. Estas sustancias son de naturaleza química compleja y tienen diferentes propiedades (Vaillant, 2014).

Estudios de Culberson *et al.*, 1985 (como se citó en Vaillant, 2014) demostraron que la composición química de los líquenes está determinada por la constitución genética del componente fúngico.

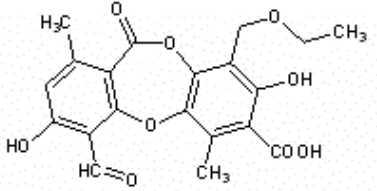
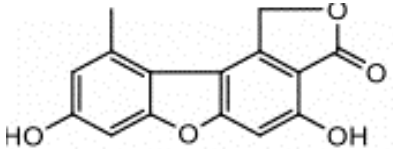
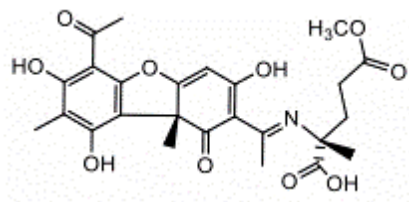
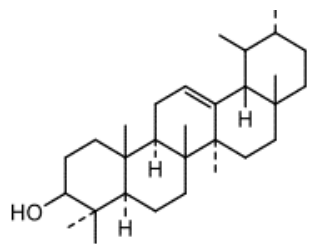
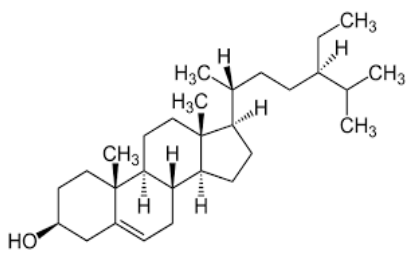
Los metabolitos primarios son esenciales para el desarrollo del liquen y son similares a los que están presentes en las plantas superiores, mientras los metabolitos secundarios tienen un rol biológico fundamental, dentro del metabolismo primario se sintetizan aminoácidos, péptidos, proteínas, polioles y polisacáridos (Castro, 2016). Dentro de los metabolitos secundarios, se encuentran los compuestos cuya particularidad presentan anillos fenólicos en sus moléculas como son las cromonas, xantonas, ácido púlvico, las antraquinonas, aminoácidos, ácidos grasos, lactonas macrocíclicas, aromáticos monocíclicos, terpenoides, esteroides y carotenoides. (Córdor, 2012; Rodríguez, 2015). Otro segundo grupo, lo constituyen los compuestos liquénicos, estas son sustancias sintetizadas única y exclusivamente por los líquenes, estos corresponden a estructuras bien determinadas, clasificados como dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos, que son sintetizadas en cantidades entre el 1 al 10 % de su peso seco. Estas sustancias por su naturaleza antibiótica probablemente impidan el ataque de microorganismos. (Castro, 2016). En la Tabla 1 y 2 se muestran metabolitos secundarios presentes en diferentes especies liquénicas.

**Tabla 1.** Compuestos reportados de especies líquénicas.

Especie	Compuesto hallado	Tipo de metabolito	Referencia
<i>Usnea difracta</i>	 ácido linoleico	Lípido	Albornoz, 2019
<i>Stereocaulon glareosum</i>	 ácido glucónico	Poliol	Calla, 2018
<i>Caloplaca saxicola</i>	 parietina	Antraquinona	Castro, 2011
<i>Stereocaulon paschale</i>	epóxido de luteína	Carotenoide	Czeczuga <i>et al.</i> , 1987
<i>Usnea Cornuta</i>	 ácido menegazziaico	Dépsido	Castañeta, 2020

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 2.** Compuestos reportados de especies liquénicas.

Especie	Compuestos hallados	Tipo de metabolito	Referencia
<i>U. antarctica</i>	 ácido cetrárico	Depsidona	Viteri <i>et al.</i> , 2011
<i>Stereocaulon azureum</i>	 estrepasilina	Dibenzofurano	González <i>et al.</i> , 1992
<i>Stereocaulon alpinum</i>	 usimina A	Ácido úsnico	Seo <i>et al.</i> , 2008
<i>Stereocaulon azureum</i>	 α-amirina	Triterpeno	González <i>et al.</i> , 1992
<i>Usnea durietzii</i>	 β-sitosterol	Esterol	Zelada <i>et al.</i> , 2012

Fuente: Elaboración propia.



## **2.3. Rutas biosintéticas**

Los líquenes producen diversos metabolitos secundarios a través de 3 rutas biosintéticas, las cuales son: la vía metabólica del acetil polimalonil, la vía del ácido mevalónico y por la vía del ácido shikímico. A continuación, se explican cada una de ellas.

### ***2.3.1. Ruta del acetil polimalonil***

La mayoría de los metabolitos secundarios son biosintetizados por esta vía, que da origen a compuestos ácidos y ésteres de tipo alifático, fenoles simples, derivados de hidroxibenzoico, compuestos aromáticos, dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos (Perico, 2011); además pertenecen a esta clasificación otros compuestos aromáticos como cromonas, xantonas, naftoquinonas, antronas y antraquinonas. Estas sustancias además de ser biosintetizadas por hongos de vida libre o plantas superiores también ocurren en líquenes, pero no son exclusivos de estos organismos (Castro, 2016).

### ***2.3.2. Ruta del ácido mevalónico***

Esta vía está principalmente involucrada en la biosíntesis de diterpenos, triterpenos, esteroides y carotenoides derivados biogenéticamente del ácido mevalónico.

Los esteroides y terpenos son poco comunes en líquenes respecto a las plantas superiores. Sin embargo, esteroides conocidos como el ergosterol, fitoesterol y  $\beta$ -sitosterol se encuentran en algunas especies liquénicas (Castro, 2016).

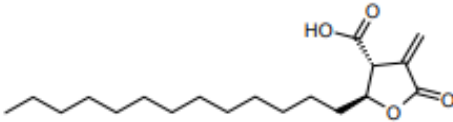
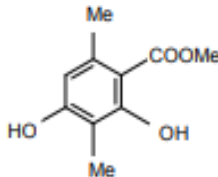
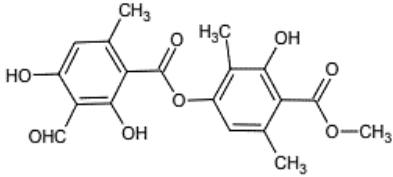
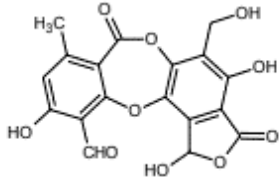
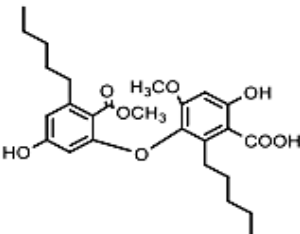
### **2.3.3. Ruta del ácido shikímico**

Los compuestos biosintetizados por esta vía presentan como intermediarios derivados fenilpropanoides que se condensan dando origen a compuestos químicos entre otros como los ácidos polipóricos y telefórico y derivados del ácido pulvínico (Castro, 2016). Mientras que Perico (2011) afirma: “Por la vía del ácido shikímico se producen derivados de ácido pulvínico, ciclopéptidos, derivados quinolínicos y otros compuestos fenólicos”, también reportan micosporinas y aminoácidos tipo micosporina (MAAs) y escitonemina, que también se produce en algas o cianobacterias además de los líquenes (Calla, 2018).

“Se conoce que se han aislado más de 700 metabolitos secundarios de diversas especies de líquenes y se considera que la mayoría de estos son únicos a estos organismos, el grupo más diverso y abundante entre estas sustancias liquénicas, son los policétidos, destacando los de tipo aromático, denominados dépsidos, depsidonas y tridépsidos” (Perico, 2011).

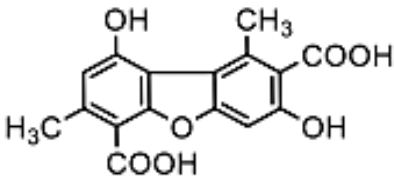
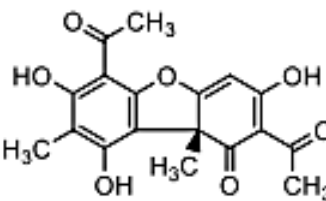
En las Tablas 3, 4, 5 y 6 se muestran ejemplos representativos de metabolitos secundarios según sus rutas biosintéticas.

**Tabla 3.** Clasificación de compuestos liquénicos según la ruta del acetil polimalonil.

Ruta	Categoría	Ejemplo
Acetil polimalonil	Ácidos orgánicos	 Ácido protoliquesterínico
	Derivados de ácidos benzoicos	 β -orcinol carboxilato de metilo
	Dépsidos	 Atranorina
	Depsidonas	 Ácido salazínico
	Difeniléter	 Ácido epiforélico

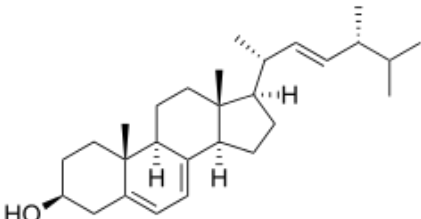
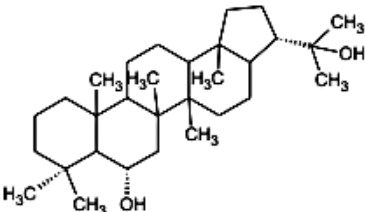
Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 4.** Clasificación de compuestos liquénicos según la ruta del acetil polimalonil

Ruta	Categoría	Ejemplo
Acetil polimalonil	Dibenzofurano	 Ácido panárico
	Ácidos úsnicos	 (+) - ácido úsnico

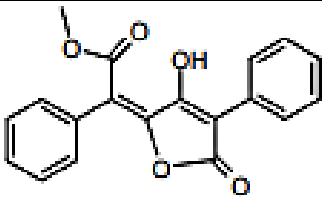
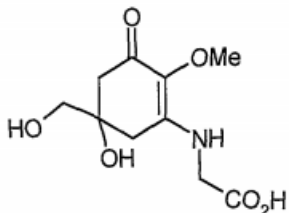
Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 5.** Clasificación de compuestos liquénicos según la ruta del ácido mevalónico

Ruta	Categoría	Ejemplo
Ácido mevalónico	Esteroides	 Ergosterol
	Terpenos	 Zeorina

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 6.** Clasificación de compuestos liquénicos según la ruta del ácido shikímico

Ruta	Categoría	Ejemplo
Ácido shikímico	Derivados del ácido pulvínico	 ter metílico del ácido vulpínico
	Micosporina	 Micosporina-glicina

Fuente: Elaboración propia.

#### 2.4. Género *Usnea*

El género *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) es uno de los géneros que cuenta con un mayor número de especies, entre 300 y 600 dependiendo de los autores (Vega 2016; Wirtz *et al.*, 2006; Araujo 2015), y una amplia distribución desde las zonas polares hasta las áreas tropicales. Presenta varios subgéneros, siendo el subgénero *Neuropogon* el que agrupa a la mayoría de las especies antárticas. (Vega, 2016).

Vega (2016) afirma “La distribución de este género es más frecuente en la región alta de los Andes y sur de América del Sur, las Islas Malvinas, Oceanía y la Antártida. En la Península Antártica, es donde podemos encontrar la mayor abundancia y diversidad de especies extendiéndose en las zonas libres de hielo, donde pueden llegar a cubrir, desde unas pocas áreas, a varios cientos de hectáreas”.

Núñez y Vela (2008): “Algunas especies de este género son utilizadas para medir la polución del aire debido a su sensibilidad, otras son utilizadas en medicina y otras como antibióticos o agentes antimicóticos”.

#### **2.4.1. Descripción taxonómica**

Son líquenes fruticulosos, generalmente largos de tamaño mediano a grande y de porte arbustivo, con ejes bastante ramificados, erectos, decumbentes o pedúnculos, unidos al sustrato por un disco de fijación. Las ramificaciones muestran una sección más o menos circular, además presentan superficies lisas o ligeramente abruptas, brillantes o mates, generalmente amarillo intenso o verdoso. En ciertas especies el talo está teñido y presenta una coloración rojiza o anaranjado. Las ramas pueden estar provistas de soradios y/o isidios, pseudoisidios, fibrillas y tubérculos, fácilmente reconocibles por la presencia de ácido úsnico en el córtex externo (que le proporciona su característica coloración de amarillo verdoso) y un característico eje central cartilaginoso (Vega 2016; Araujo, 2015) además de un apotecio en forma de disco color marrón oscuro o negro.

#### **2.4.2. Características químicas**

El género *Usnea* presenta gran variedad de especies. La presencia constante de ácido úsnico en el córtex sirve como carácter taxonómico. (Araujo, 2015).

En el Perú en la especie *U. durietzii* se determinó la presencia de quinonas, triterpenos y esteroides; en menor cantidad, fenoles, taninos, grasas, lactonas y cumarinas, azúcares y

flavonoides, además se logró aislar y caracterizar ácido úsnico y ácido salazínico (Zelada, 2012). Viteri *et al.* (2016) realizaron el estudio químico en la *U. antarctica*, encontrando cuatro compuestos como metabolitos secundarios, dos ya reportados en la literatura: ácido úsnico y ácido cetrárico (depsidona), y dos compuestos reportados por primera vez: ácido desmetil seudoplacodiólico y ácido desmetil placodiólico.

La caracterización de los compuestos secundarios resulta de gran ayuda en la identificación de los ejemplares de *Usnea*, ya que la mayoría de los taxones son muy variables y muchos de los caracteres morfológicos pueden solaparse entre diferentes especies. (Araujo, 2015).

De la gran variedad de compuestos fenólicos presente en los líquenes, el más estudiado ha sido el ácido úsnico desde que fue aislado en 1843 por Rochleder y Heldt. Tiene por característica un pigmento amarillo, es un derivado del dibenzofurano y ocurre como enantiómero (+) o D- ácido úsnico y enantiómero (-) o L- ácido úsnico, según la posición del grupo  $-CH_3$  (Castro, 2016) y aparece extensamente distribuido en distintos géneros de líquenes entre los que se encuentran *Alectoria*, *Cladonia*, *Ramalina*, *Lecanora*, *Evernia* y *Usnea* han sido ampliamente utilizados en medicina en todo el mundo. (Vega, 2016).

La especie de esta investigación no reporta estudios fitoquímicos a nivel nacional e internacional desde la perspectiva que se toma en esta investigación.

## **2.5. *Usnea aurantiaco-atra***

### **2.5.1. *Taxonomía y características botánicas***

El liquen fue identificado por el Biólogo Ángel Ramírez del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y presenta la siguiente clasificación:

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Lecanoromycetes
Orden	Lecanorales
Familia	Parmeliaceae
Género	<i>Usnea</i>
Especie	<i>Aurantiaco-atra</i>

Presenta talos fruticulosos más o menos dorsiventral de color amarillo-verdoso bandeados de negro, de 30 a 60 mm de altura, que crece en forma de hierba de césped. Sus ejes principales y ramificaciones presentan una dicotomía regular. Ramas cilíndricas, generalmente con una pigmentación negra heterogénea de forma continua hacia los ápices o puntas.

Es característica de esta especie la ausencia de soledios e isidios, presentando en su lugar, numerosas prominencias verrucosas sobre su talo. Son característicos sus abundantes apotecios en los ejes terminales, en forma de copa de hasta 8 mm de diámetro, de color negro (Vega, 2016), ver Figura 1.





**Figura 1.** Especie *U. aurantiaco-atra*. Fuente: Elaboración propia.

## 2.6. Usos y aplicaciones de los líquenes

Los líquenes han sido utilizados en la medicina tradicional por sus propiedades antibióticas, sobre todo aquellos líquenes que producen ácido úsnico.

Algunos líquenes son utilizados como alimentos en países europeos como ejemplo de esto tenemos a *Cetraria islandica*, *Umbilicaria sp.* y *Lecanora esculenta* este último es conocido comúnmente como maná hebreo, además con propósitos industriales, como productores de colorantes, en cosméticos y en decoración. (Rodríguez *et al.*, 2015). Por ejemplo, Molina (2014) “La industria perfumera utiliza fenoles y ácidos grasos esenciales extraídos de *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfuracea* como fijadores del perfume”.

En la actualidad, se utilizan como indicadores de contaminación ambiental, ya que la limitada capacidad de absorber y acumular diversas sustancias presentes en el ambiente ocasiona

que la mayoría de los líquenes no toleren la contaminación, al acumular estas sustancias y su incapacidad de poder excretarlas altera su ciclo de vida y son los primeros en desaparecer. Al ser muy susceptibles, presentan reacciones que se correlacionan con las respuestas de su entorno, registran rápidamente las variaciones de los caracteres físicos y químicos del ambiente se integran entre los grupos biológicos, indicadores naturales o bioindicadores de la contaminación atmosférica (Gonsález, 2007), otro modo es como bioindicadores de salud forestal o calidad de corchos además de aplicaciones relacionadas con bioproducción, biodeterioro y bioensayos (Barrales, 2017). Entre los diversos papeles que desempeñan los líquenes, también se han utilizado para elaborar fármacos antiinflamatorios, antitumorales, antimicóticos y antibióticos, debido a sus propiedades farmacológicas, capacidad quelante, reacciones fotoquímicas ligadas a cationes entre otras (Castro, 2004). Hoy en día los líquenes están involucrados en muchas aplicaciones, como una nueva alternativa en busca de soluciones.

## **2.7. Actividad antibacteriana en los líquenes**

El entusiasmo científico que siguió al descubrimiento de los antibióticos y su contribución fundamental a la salud humana provocó la búsqueda de nuevos principios activos contra los microorganismos patógenos (Vega, 2016).

Dieu (2010) alega: “Para los metabolitos secundarios como dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos o xantonas, se ha demostrado que exhiben propiedades antibióticas, antifúngicas, antivirales, antioxidantes o antipiréticas”. Por ello los líquenes han sido utilizados en la medicina popular por sus propiedades antibióticas, debido a que acumulan alta concentración de metabolitos

que pueden almacenar en su talo, muchos de los cuales están involucrados en su actividad antimicrobiana (Rodríguez *et al.*, 2015).

La actividad antibacteriana de los líquenes se le atribuye al ácido úsnico; asimismo, otros estudios han relacionado esta actividad a compuestos terpénicos y esteroides, cabe recalcar que la producción de este tipo de compuestos se produce ya sea en plantas u hongos en condiciones desfavorables es decir en condiciones de estrés para el ser vivo (Flores, 2017).

Los esteroides forman parte de los esteroides (triterpenos modificados) y se encuentran ampliamente distribuidos en muchas especies, incluyendo algas, plantas, líquenes, hongos, etc.; entre los más comunes se encuentran el ergosterol. El ergosterol se oxida para formar peróxido de ergosterol compuesto que se ha reportado por poseer características benéficas para la salud como antiviral, antitumoral, inmunosupresor, antiplasmodial, antiinflamatorio, lo que lo presenta como un compuesto prometedor (Morales, 2019).

### **2.7.1. Método de Kirbi Bauer**

Comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Consiste en el empleo de discos de papel absorbente, impregnados con una concentración conocida del antimicrobiano, para esta tesis se trata de los extractos obtenidos del liquen, a los cuales se evalúa la actividad antibacteriana. Los discos impregnados se colocan en la superficie de una placa de agar Müller-Hinton recientemente inoculada con la cepa control (microorganismo) con una turbiedad de 0,5 en la escala de McFarland. Durante el proceso de incubación, el disco se humedece, el antimicrobiano difunde radialmente hacia afuera y crea una gradiente de

concentración por disco; de este modo el antimicrobiano que se encuentra en alta concentración cerca al disco y va disminuyendo conforme se aleja. (Rodríguez *et al.*, 2005).

### 2.7.2. *Medición de halos de inhibición*

El diámetro del halo dependerá principalmente de la sensibilidad o resistencia del microorganismo a probar, la solubilidad del antimicrobiano, de la tasa de difusión del agar, medio de cultivo, su espesor, el tiempo de incubación, concentración de bacterias inoculadas entre otros son factores que también influyen en el ensayo, por eso es importante mantenerlos controlados. Si se presentan zonas de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos (Ver Figura 2), la medición de esos diámetros de inhibición y su comparación con los valores de referencia permite establecer si la cepa es resistente, moderada o sensible a esa droga, (Rodríguez *et al.*, 2005), en este caso extracto antibacteriano.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula 1 (Corzo, 2012), con el promedio de las mediciones del halo de inhibición de los extractos testeados y teniendo como referencia la medición del diámetro de la zona de inhibición del control positivo.

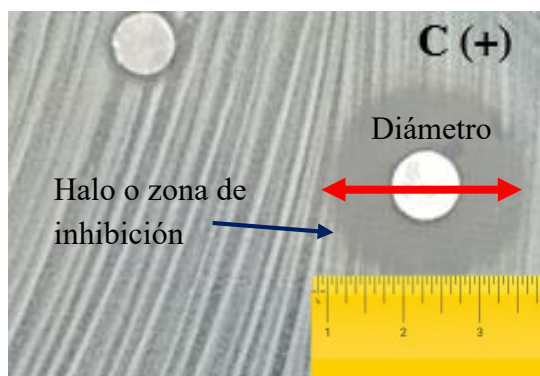
$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Ø halo extracto} - \text{Ø halo blanco}}{\text{Ø halo antibiótico} - \text{Ø blanco}}$$

Donde:

Ø halo extracto: diámetro del halo inhibitorio del extracto.

Ø halo blanco: diámetro del halo inhibitorio del solvente (control negativo).

Ø halo antibiótico: diámetro del halo inhibitorio del antibiótico (control positivo).



**Figura 2.** Modo de medición del halo de inhibición. Fuente: Elaboración propia.

Los halos de inhibición producidos por discos de antibióticos empleados como control positivo fueron verificados según los puntos de corte según el CLSI 2017 y/o la EUCAST 2019, ver Anexo 3.

En vista de que uno de los microorganismos patógenos causante de muchas enfermedades infecciosas es el *S. aureus*, en este trabajo se tomó mencionada cepa con objeto de evaluar el comportamiento antibacteriano del líquen antártico en estudio, que busca encontrar nuevas sustancias naturales que puedan tener un mecanismo de defensa nuevo y diferente para solucionar uno de los problemas más conocidos de resistencia de uso común de los antibióticos.

## **2.8. Resistencia a los antibióticos**

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de un microorganismo de resistir y sobrevivir a los efectos de un antimicrobiano que amenacen su sobrevivencia y reproducción, pues

la capacidad de mutación y su continua adaptación al medio les ha permitido desarrollar características de resistencia (Calderón y Aguilar, 2016).

En los últimos años, la aparición de numerosos mecanismos de generación de resistencia a los antibióticos, ha hecho que el manejo de las enfermedades infecciosas se vuelva un asunto complejo, sin el apoyo del desarrollo de nuevos compuestos con actividad antibacteriana (González *et al.*, 2019). Según la Organización Mundial de la Salud y el Foro Económico Mundial, la resistencia a los antibióticos es uno de los mayores problemas de salud pública mundial porque impide nuestra capacidad de controlar las enfermedades infecciosas aumentando la morbi-mortalidad, se reduce la eficacia terapéutica amenazando el progreso y causando un retroceso de la medicina moderna a la era pre-antibiótica (Calderón y Aguilar, 2016).

En este contexto además de muchas enfermedades infecciosas se han sumado numerosas y nuevas enfermedades entre ellas las de origen bacteriano tales como las infecciones por *S. aureus* (González *et al.*, 2019), tal es así, que el nuevo Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la OMS, ha revelado la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos en muestras de 500 000 personas de 22 países en las que se sospechaban infecciones bacterianas y mencionan que una de las bacterias resistentes más frecuentes es *S. aureus* (Lindmeier, 2018).

### **2.8.1. *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* es la principal especie patógena de su género con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales (Cervantes *et al.*, 2014). Es considerada la más virulenta, responsable de múltiples enfermedades tanto de origen hospitalario (especialmente

en unidades de cuidados intensivos, unidades de quemados y en neutropénicos) y comunitario, ya que el principal reservorio se encuentra en la colonización de la mucosa nasal de las personas y animales de la comunidad (Camarena *et al.*, 1999; Carmona *et al.*, 2012). La mayoría de las infecciones son leves, como la forunculosis, el impétigo y la foliculitis; pero puede producir cuadros graves que ponen en riesgo la vida de los pacientes, como la neumonía, la osteomielitis, las bacteriemias y la endocarditis (Carmona *et al.*, 2012).

Uno de los principales problemas asociados con estas enfermedades es la aparición de resistencia a los antibióticos de uso común, siendo el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), favorecido principalmente por el abuso indiscriminado de antibióticos, generando microorganismos multiresistentes e importantes repercusiones tanto en los pacientes como en los sistemas de salud provocando así la diseminación de cepas de *S. aureus* en los hospitales de todo el mundo, lo que conlleva a uno de los mayores retos terapéuticos en la actualidad para la medicina (Cervantes *et al.*, 2014). En un principio se reportó resistencia a las penicilinas naturales, esto incrementó obligando a su abandono como tratamiento, luego se reportó en Europa la aparición de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), extendiéndose posteriormente a diversas partes del mundo, como en EE. UU., Australia, Suiza, Francia, Reino Unido, Nueva Zelanda, Finlandia, Canadá, Samoa y en Sudamérica. A nivel mundial se estima que dos billones de personas están presentan esta bacteria, de ellas 1 % es por SAMR, al ser la mucosa nasal el lugar más frecuente de colonización. En nuestro país, reportaron que en un estudio multicéntrico en 6 hospitales de Lima Metropolitana encontraron 63,3 % de cepas MRSA constituyendo en la actualidad un serio problema de salud pública (Tamariz *et al.*, 2010).

### CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

#### 3.1. Materiales, Reactivos y equipos

##### 3.1.1. *Materiales*

Materiales de vidrio, metal y plástico de uso común en el laboratorio.

##### 3.1.2. *Reactivos*

Los reactivos empleados para la marcha fitoquímica y las pruebas cualitativas fueron: soluciones de  $\text{FeCl}_3$  1%, gelatina-NaCl 10%, NaOH 10%, NaOH 20%, KOH 5%, ácidos inorgánicos HCl,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , solventes orgánicos como acetona, etanol, metanol, cloroformo y éter de petróleo; reactivos solidos:  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , KI y  $\text{HgCl}_2$ . Todos los reactivos que se emplearon fueron de grado reactivo analítico.

Los reactivos empleados para el aislamiento y elucidación fueron: Acetona, diclorometano, metanol, cloroformo deuterado, metanol deuterado (todos de grado de pureza HPLC), Sephadex LH-20, Sílica gel Merck 60 Å (70-230 mesh); mientras que para la evaluación de la actividad antibacteriana los reactivos fueron: alcohol 70° y solventes orgánicos de diferente polaridad, discos antibióticos de trimetoprima, medio de cultivo: agar Müller-Hinton, patrón de turbidez: 0,5 de Mc Farland y solución salina al 0,85%.



### 3.1.3. Equipos

Agitador orbital (TermoScientific), autoclave (Yamato SM 510), balanza analítica, precisión 0,01 mg (Ohaus DV 2014 C), balanza de humedad (Sartorius MA35), campana extractora de gases (The Baker Company, Noys), cabina Workstation (ESCO), centrífuga refrigerada (Eppendorf 5804R), congeladora (Frigidaire), estufa de secado (Mettler, Elds), espectrómetro ir (TermoScientific, Nicolet iS10), espectrómetro RMN  $^1\text{H}$  (AM-400 Bruker avance equipado con sondas de 5 mm), espectrómetro UV- VIS (TermoScientific, HeLIOS Y), incubadora (Binder), incubadora (MMM group), mechero Bunsen, molino de cuchillas (Retsch ZM 200), licuadora Blender (Waring), refrigeradora (Frigidaire), Rotaevaporador (Heidolph, modelo Laborata 4003), selladora al vacío (Multivac C 100), sonicador (Symphony VWR), y UV- lámpara (Bio Rad, Universal Hood II de 50/60 Hz).

## 3.2. Análisis preliminar

### 3.2.1. Recolección

La especie en estudio fue recolectada durante la 25ª Expedición Científica Peruana (ANTAR XXV – 2018) de la Estación Científica Antártica "Machu Picchu" ubicada a una latitud 62°05'30'' S, longitud 58°28'16'' W (Contreras *et al.*, 2014) a una temperatura entre -2 a -9 °C y 50 a 70% de humedad relativa, estos últimos datos fueron reportados por los investigadores del Instituto Tecnológico de la Producción durante la expedición científica en la Isla Rey Jorge-Antártida. La muestra fue proporcionada por el ITP.

### 3.2.2. *Secado y molienda*

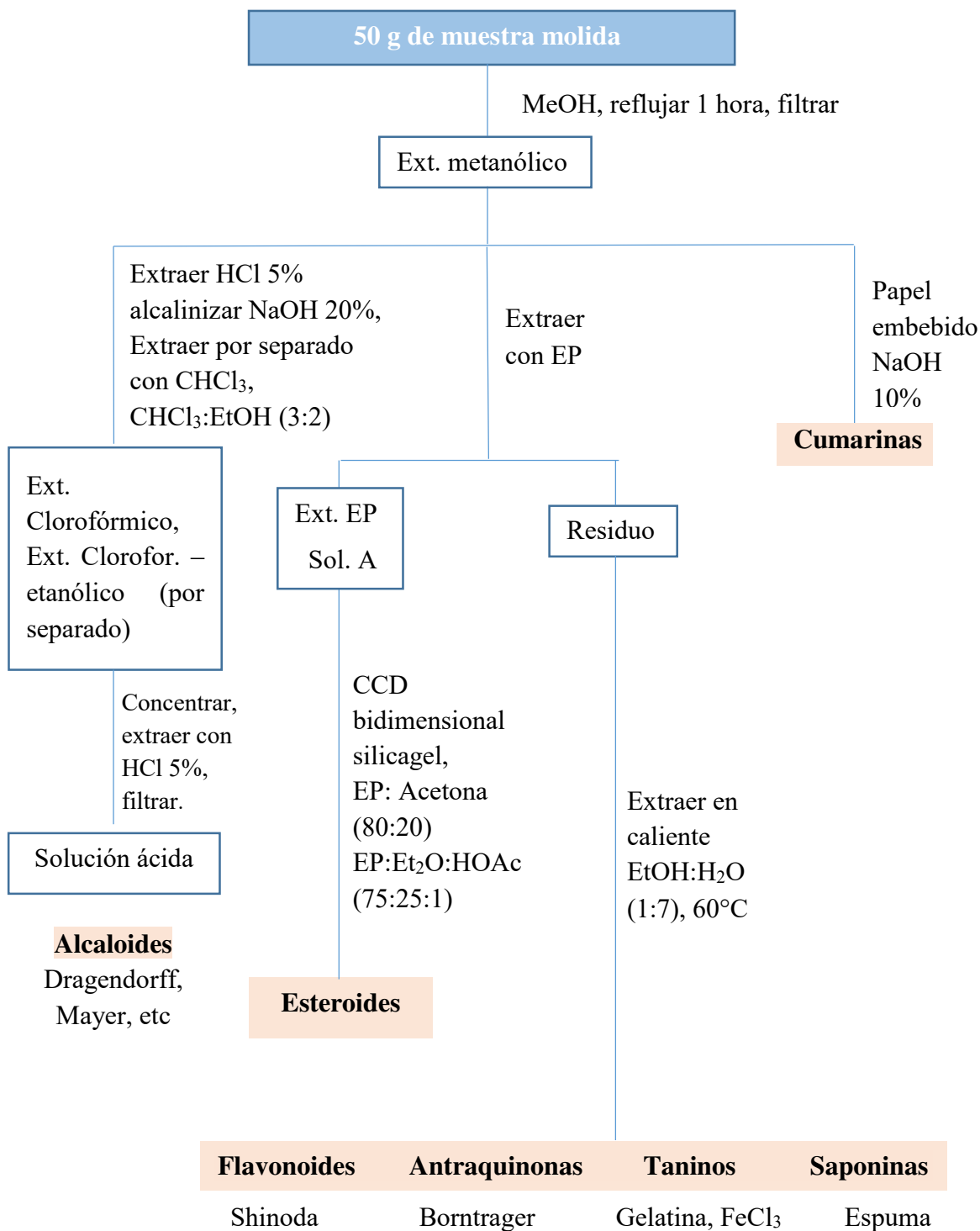
La muestra después de su recolección se secó en una estufa a 40°C durante dos horas y se almacenó en empaque al vacío hasta su uso.

Se realizó una primera molienda para reducir el tamaño de la muestra con un molino sencillo de trituración, luego la segunda molienda se realizó con ayuda de un molino ultracentrífugo ZM 200 hasta obtener polvo fino, partículas de tamaño menor a 40 µm.

### 3.3. *Marcha fitoquímica*

Se realizó el análisis fitoquímico para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos presente en la especie *U. aurantiaco-atra*, para ello se tomó 50 g de la muestra molida del liquen.

Este análisis se basó en los procedimientos de la marcha fitoquímica de Look de Ugaz (1994) modificada solo en la determinación de cumarinas que a partir del extracto metanólico obtenido después del reflujo se realizó directamente la prueba cualitativa para la identificación de cumarinas, esto se realizó con el fin de aprovechar el extracto alcohólico que ya se tenía y así evitar hacer un proceso de identificación más laborioso. Todas las identificaciones de los metabolitos secundarios se realizaron mediante las pruebas cualitativas y ensayos descritos en la Guía de Prácticas Laboratorio de Productos Naturales del departamento de Química Orgánica, que consiste en pruebas de coloración y precipitación, además de cromatografía en capa delgada. En la Figura 3 se muestra el diagrama de la marcha fitoquímica e identificación de metabolitos secundarios.



**Figura 3.** Marcha fitoquímica de la muestra seca y molida *U. aurantiaco – atra*. Fuente: Marcha fitoquímica de Look de Ugaz, 1994.

Siendo: EP: Éter de petróleo, Et<sub>2</sub>O: Etóxietano, HOAc: Ácido acético, EtOH: Etanol, H<sub>2</sub>O: Agua.

### 3.3.1. Identificación de alcaloides

#### a) Reactivo de Dragendorff

Preparación del reactivo de Dragendorff: Se disolvió 8 g de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  20 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado y se mezcló con 50 mL de una solución acuosa que contenía 27,7 g de KI, se dejó reposar la solución, se decantó el sobrenadante y diluyó a un volumen de 100 mL.

En una placa de toque se añadió dos gotas de la solución ácida proveniente del extracto clorofórmico y se agregó 4 gotas de reactivo Dragendorff. En otra placa se añade dos gotas de la solución ácida proveniente del extracto clorofórmico-etanólico y se agregó 4 gotas de reactivo Dragendorff la aparición de un precipitado que va del naranja al rojo se considera como reacción positiva.

#### b) Reactivo de Mayer

Preparación del reactivo: Se disolvió 1,36 g de  $\text{HgCl}_2$  en 60 mL de agua y se adicionó 10 mL de una solución que contenía 5 g de KI y se diluyó hasta un volumen de 100 mL.

En una placa de toque se añadió dos gotas de la solución ácida proveniente del extracto clorofórmico y se agrega 4 gotas de reactivo de Mayer, la aparición de un precipitado blanco o crema, se considera como reacción positiva. Se realizó de igual modo para la solución ácida proveniente del extracto clorofórmico-etanólico.

#### c) Reactivo de Wagner

Preparación del reactivo: Se disolvió 1,27 g  $\text{I}_2$  en la mínima cantidad de agua y se agregó una solución acuosa que contenía 2 g de KI y se diluyó hasta un volumen de 100 mL.

En una placa de toque se añadió dos gotas de la solución ácida proveniente del extracto clorofórmico y se agregó 2 gotas de reactivo de Wagner, la aparición de un precipitado color marrón se considera como reacción positiva. Se realizó de igual modo para la solución ácida proveniente del extracto clorofórmico-etanólico.

### **3.3.2. *Identificación de flavonoides***

#### **a) Reactivo de Shinoda**

Se colocaron 4 gotas de la solución B con una limadura de magnesio en una placa de porcelana, con un gotero se añadió 3 gotas de HCl concentrado. La aparición de coloración naranja a rojo indica la presencia de flavonoides.

#### **b) Reacción de Cloruro Férrico**

En una placa de porcelana colocaron 4 gotas de la solución B, se le agregaron 4 gotas de la solución de  $\text{FeCl}_3$  1%, instantáneamente la solución toma un color verde oscuro o azul, lo que indicaría la presencia de compuestos fenólicos y taninos.

#### **c) Reacción con NaOH 20%**

Se colocaron 4 gotas de la solución B y se agregaron 4 gotas de reactivo NaOH 20%. Se obtiene una coloración naranja amarillento.

### **3.3.3. *Identificación de quinonas – antraquinonas***

**a) Reacción de Borntrager**

La solución B se trató con unas gotas de KOH 5% en caliente, se filtró, se enfrió y se aciduló con HCl 20%, se añadió benceno y luego de agitar se dejó en reposo. Luego de formarse dos fases, se separó la fase bencénica a la cual se le añadió unas gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . La formación de una coloración rosada a roja indicara la presencia de antraquinonas. Dejar transcurrir el tiempo necesario para que la reacción ocurra.

**3.3.4. Identificación de taninos****a) Reacción con gelatina - NaCl**

A 1 mL de solución B se agregaron 3 gotas de gelatina- NaCl 10%, en un principio se forma una sustancia en forma de nube en la solución, luego se centrifugó y queda en el fondo un precipitado de color blanco. Este confirma la presencia de taninos.

**b) Reacción con  $\text{FeCl}_3$** 

A 1 mL de solución B se añadió 1 mL de  $\text{FeCl}_3$  1%, una coloración negra azulado indica que el tanino pertenece a los derivados del ácido pirogálico y si da verde deriva de la catequina.

**3.3.5. Identificación de saponinas****a) Prueba de la espuma**

En un tubo de ensayo se colocó una pequeña cantidad de solución B y se añadió agua destilada, luego se agito vigorosamente por 3 minutos, se observó la persistencia de la espuma formada.

**b) Reactivo de Salkowski**

En un tubo de ensayo se colocó una pequeña cantidad de muestra sólida (extracto metanólico seco), se le añadió 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y 5 gotas de anhídrido acético.

**c) Variante A de Reacción de Salkowski**

A una pequeña cantidad de muestra sólida se le agregó anhídrido acético refrigerado más una gota de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado por las paredes y se agitó.

**d) Reactivo de Lieberman-Burchard**

A una pequeña cantidad de muestra sólida se añadió gotas de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  más 3 mL de  $\text{AC}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$  (50:1).

**3.3.6. Identificación de esteroides**

Se realizó una CCD bidimensional a la solución A, y se empleó como eluyentes los sistemas EP: Acetona (80:20) y EP: $\text{Et}_2\text{O}$ :HOAc (75:25:1).

**3.3.7. Identificación de cumarinas**

Se separó una pequeña cantidad del extracto metanólico de partida, a este se le realizó las siguientes pruebas:

En un papel filtro rectangular se colocó dos gotas de extracto metanólico de la muestra por duplicado (la muestra y uno blanco),  $A_1$  y  $A_2$ .

A la muestra A<sub>1</sub> se le añadió dos gotas de NaOH 10%, mientras que a A<sub>2</sub> no se le añadió nada, luego se comparó la fluorescencia que emitían estos extractos haciendo uso de una lámpara UV a 365 nm. Cuando hay cumarina fija no hay cumarina volátil.

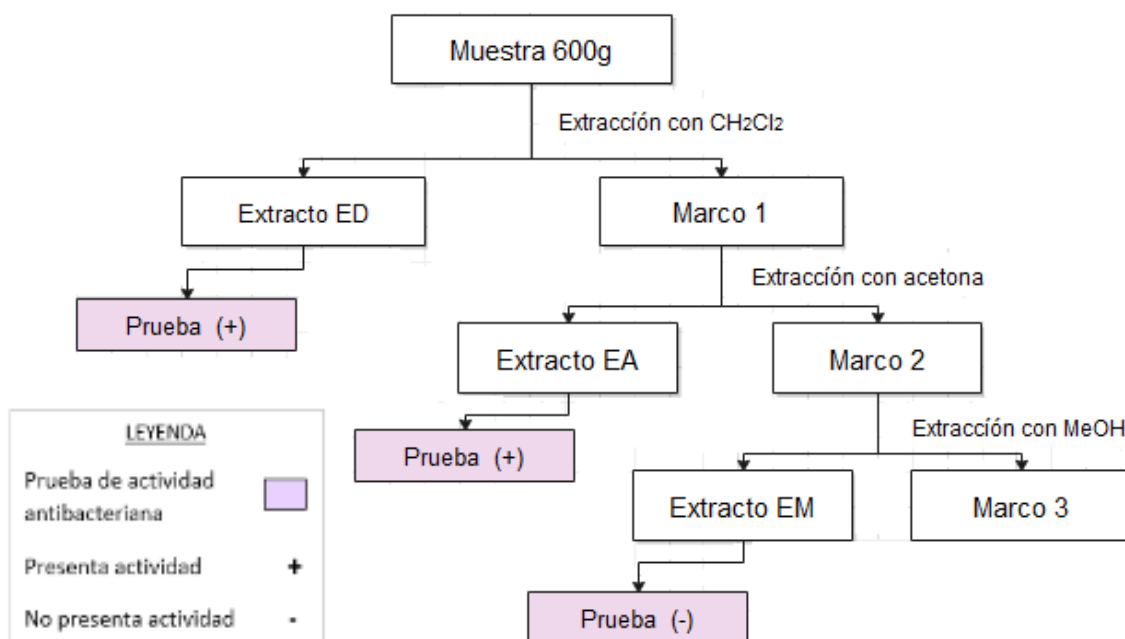
### **3.4. Aislamiento**

#### ***3.4.1. Extracción sólido – líquido***

600 g de muestra limpia, seca y molida, se sometió a tres extracciones sucesivas con 3 solventes de diferente polaridad por el método de extracción por ultrasonido a temperatura ambiente por dos horas a 300 rpm, este procedimiento sustituye la técnica de extracción por maceración clásica. En primer lugar, se extrajo con 3 L de diclorometano, obteniéndose aproximadamente 450 mL de extracto que fue separado por filtración. El sólido remanente se volvió a extraer con 5 L acetona, obteniéndose 750 mL de extracto y finalmente el restante se extrajo con 7 L de metanol, obteniéndose 1 L de extracto. Se concentraron los extractos independientemente en un rotavapor hasta disminuir a la tercera parte en volumen y luego de un proceso de volatilización del solvente a temperatura ambiente, se obtuvo 8,5 g del primer extracto al cual llamamos ED, 6,3 g del segundo extracto llamado EA y 12,6 g del tercer extracto llamado EM, cada extracto fue sometido a un ensayo para evaluar la actividad antibacteriana estos datos se reportan en la Tabla 8 y el diagrama de separación de los extractos se observa en la Figura 4.

Se analizó la solubilidad de los extractos secos en distintos solventes de polaridad creciente como por ejemplo hexano, éter de petróleo, cloroformo, acetona, metanol, para llevar a cabo un análisis de cromatografía en capa delgada (CCD).





**Figura 4.** Separación sucesiva por solvente. Fuente: Elaboración propia.

### 3.5. Separación y purificación

#### 3.5.1. Análisis por cromatografía en columna (CC)

La separación para los extractos ED, EA y EM se realizó mediante CC, utilizando como fase estacionaria sílica gel. Para todas las veces que se realizó esta experiencia, el empaquetamiento de la columna se realizó al finalizar el día, para que por gravedad el relleno pueda ocupar correctamente el interior de la columna, previo a esto en un vaso de precipitado se pesó una cantidad de sílica entre 20 – 40 g, según las dimensiones de la columna, se añadió una pequeña porción de la fase móvil para tratar de solubilizar la sílica y se vertió lo más rápido posible en la columna cromatográfica con ayuda de una bagueta y se añadió una cantidad considerable de

eluyente para evitar que la columna llegue a secarse, así evitar la formación de burbujas de aire, si estas llegaran a formarse, con ayuda de una bagueta dar pequeños golpes en el exterior, finalmente cerrar los orificios inferior y superior de la columna, de este modo al día siguiente ya está lista para poder emplearse.

Las condiciones de cromatografía 1 (CC 1) consta de 2 cm de diámetro y 22 cm de altura del relleno de la columna, de este modo se llevó a cabo la separación de los extractos iniciales para la obtención de las fracciones. Para la obtención de las fracciones del extracto ED, se utilizaron los sistemas de elución 1, iniciando con el sistema EP:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , luego el sistema  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona y finalmente Acetona: MeOH según el gradiente de polaridad en relación al volumen tal como se muestra en la Tabla 7, obteniéndose un total de 26 fracciones.

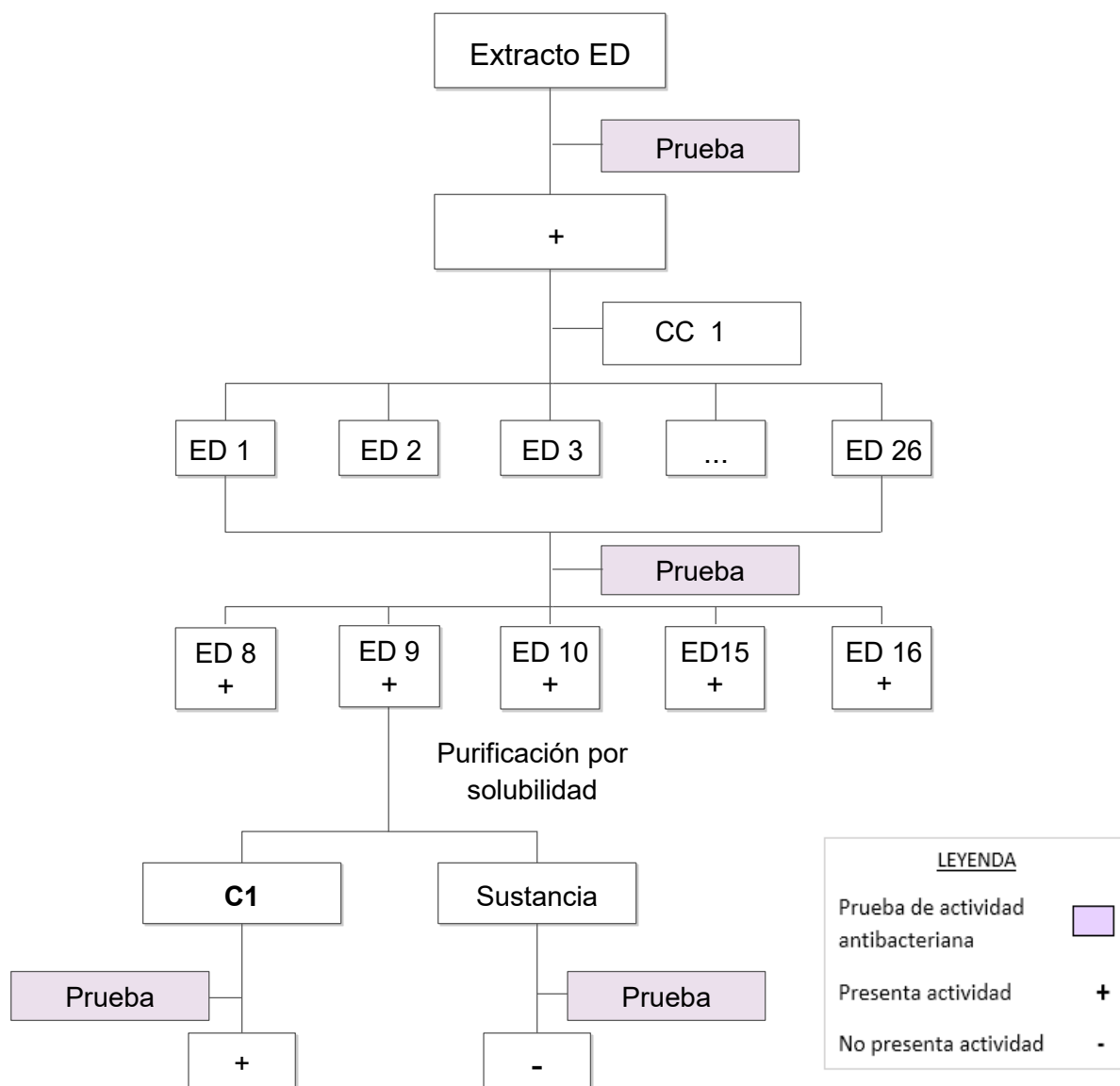
**Tabla 7.** Relación en volumen para cada sistema de elución empleado en CC.

Código	Sistema de elución	Gradiente Relación (v/v)
1	EP : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 0:5 = a
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona	10:0, 9:1, ..., 0:10 = b
	Acetona : MeOH	a
2	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona	a
	Acetona : MeOH	b
3	Acetona : Butanol	a
	Butanol : MeOH	a
4	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH	0,5 : 9,5
5	$\text{CHCl}_3$ : MeOH	6:1
6	Tolueno : MeOH	19:1, ..., 15:5

Nota: a y b corresponden a las proporciones secuenciales en volumen según el aumento de polaridad

Fuente: Elaboración propia.

A todos los extractos fraccionados, se les realizó el ensayo de actividad antibacteriana, de este modo se tomó como criterio de selección aquellas fracciones que dieron respuesta positiva a la prueba, tras presentar un halo de inhibición de 9 mm según Valgas *et al.* (2007) y además, que se tenga una cantidad considerable para continuar con los procedimientos posteriores. Así, la fracción ED 9 se purificó por solubilidad, obteniéndose un sólido de color amarillo el cual llamamos compuesto C1 y otra sustancia de color blanco, con masas aproximadamente de 1 g y 20 mg respectivamente, de los cuales solo el compuesto C1 presentó actividad antibacteriana y cumplió con los demás criterios de selección. La Figura 5 muestra el procedimiento de separación del extracto ED.



**Figura 5.** Separación del extracto ED. Fuente: Elaboración propia.

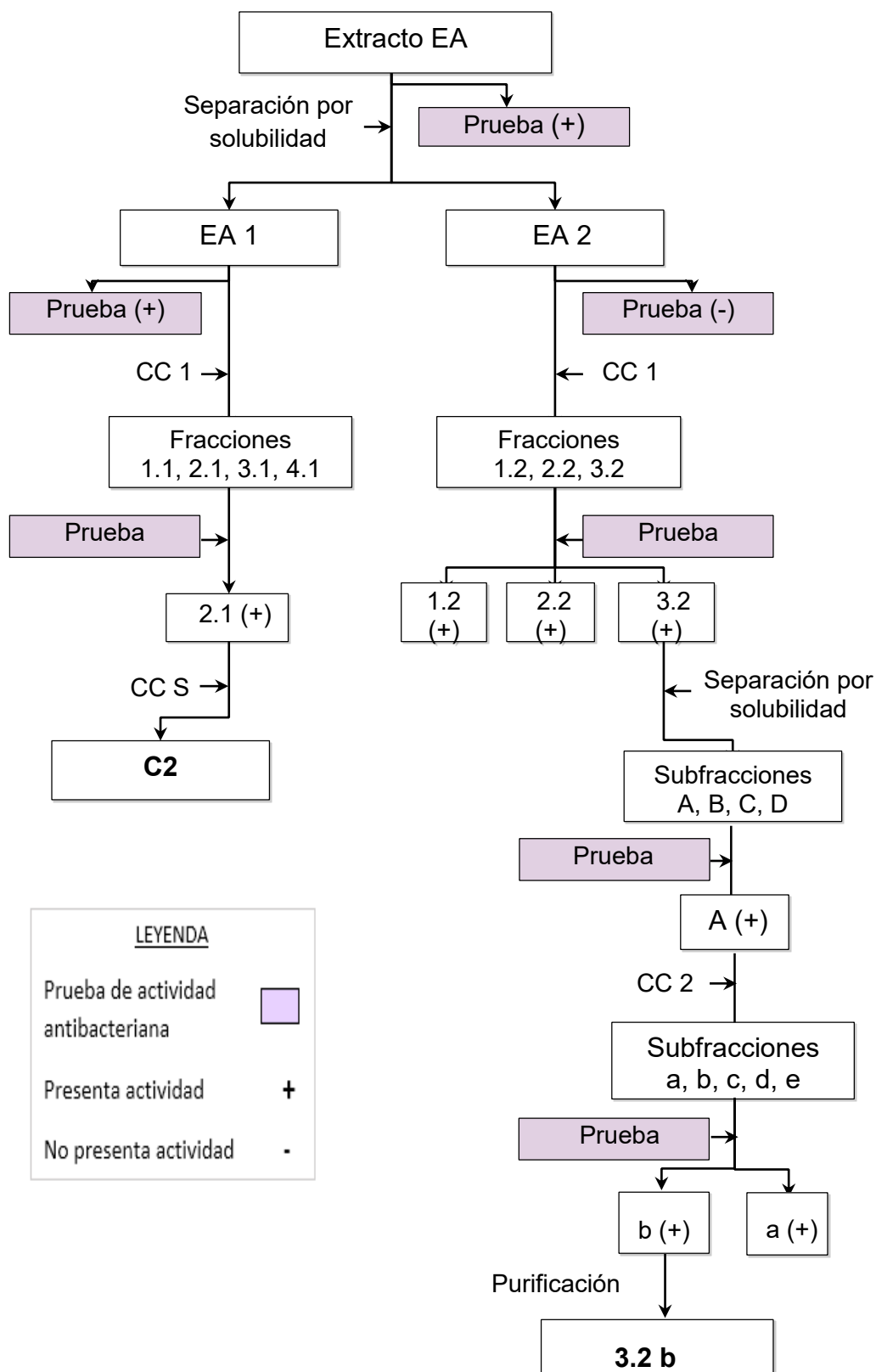
La separación del extracto EA se realizó en base a la solubilidad de sus componentes en acetona, a la porción soluble en acetona se le llamó EA 1 y a la porción insoluble como EA 2, para ambos extractos se evaluó su actividad resultando positivo para EA 1 y negativo para EA 2.

La separación en fracciones se realizó para cada extracto por CC, para EA 1 se utilizó los sistemas de elución 2, mientras que para EA 2 los sistemas de elución 3, que consisten de soluciones con gradiente de polaridad cuyas relaciones de volumen se observan en la Tabla 7,

iniciando desde el sistema  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : acetona hasta Acetona: MeOH empleado para EA 1 e iniciando desde el sistema Acetona : Butanol hasta Butanol : MeOH empleado para EA 2, obteniéndose 3 y 4 fracciones para EA 1 y EA 2 respectivamente, donde la codificación fue 1.1, 2.1 y 3.1 para EA 1 y 1.2, 2.2. 3.2 y 4.2 para EA 2, se realizó la evaluación de actividad antibacteriana, en el cual las fracciones que mostraron actividad fueron 2.1 proveniente de EA 1 y 1.2, 2.2, y 3.2 de EA 2.

La purificación de 2.1 se llevó a cabo por una CC en Sephadex (CC S), las características de la columna fueron 3 cm de diámetro y 30 cm de altura del relleno de la columna y se utilizó como eluyente el sistema 4 que se muestra en la Tabla 7, procedimiento por el cual se obtuvo 20,2 mg del compuesto C2, del cual se comprobó su pureza por medio de una CCD con una muestra pura de peróxido de ergosterol (Ver Figura 13, apartado de resultados y discusión de resultados).

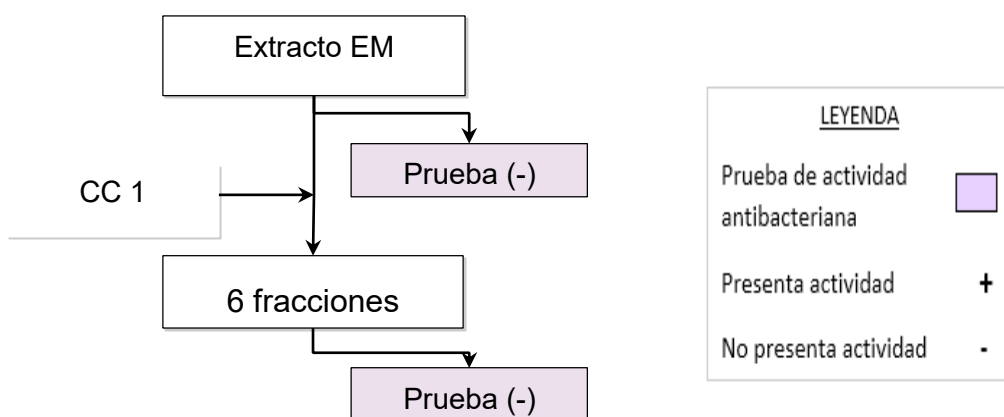
De las fracciones provenientes de EA 2, todas dieron positivo a la prueba de actividad, se seleccionó aquella que cumplía todos los criterios de selección. Esta fue 3.2, la cual se separó en sus componentes por técnicas de solubilidad obteniéndose subfracciones más puras llamadas A, B, C y D; las cuales fueron sometidas a la evaluación de actividad antibacteriana y solo la subfracción A mostró actividad positiva, esta última fue sometida a purificación por cromatografía en columna 2 (CC2), que consta de una columna cromatográfica de un diámetro de 1 cm de diámetro y 22 cm de altura del relleno de la columna y en la cual se empleó el sistema de elución 5 que corresponde a  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (6:1) tal como se muestra en la Tabla 7. Esta separación dio como resultado los componentes a, b, c, d y e provenientes de la subfracción A. Luego del ensayo de actividad antibacteriana, quienes dieron resultado positivo fueron los componentes a y b. Bajo los criterios de selección descritos anteriormente se purificó b, obteniéndose un sólido de color crema con una masa de 15,3 mg, al cual se le llamó 3.2 b. El diagrama separación de EA 1 y EA 2 se muestran en la Figura 6 y los datos experimentales de los compuestos puros en la Tabla 9.



**Figura 6.** Separación del extracto EA. Elaboración propia.

La separación del extracto EM se realizó con los sistemas de elución 6 que corresponde a soluciones de polaridad menor hasta llegar a relaciones de volúmenes de mayor polaridad, Tolueno: Etanol (19:1, ..., 15:5), como se muestra en la Tabla 7. Se obtuvo 24 fracciones y éstas según su  $R_f$ , obtenido en CCD, se agruparon en 6 fracciones. No se continuó el procedimiento de separación pues tanto el extracto EM como sus fracciones no mostraron resultado positivo en el ensayo de actividad antibacteriana.

A continuación, la Figura 7 muestra el esquema representativo del proceso de separación y purificación del extracto EM.



**Figura 7.** Separación del extracto EM. Elaboración propia.

De manera general, se muestran las técnicas de extracción y separación empleadas en la muestra líquénica en el Anexo 1.

### 3.6. Actividad antibacteriana

### **3.6.1. *Microorganismo de prueba***

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se empleó el microorganismo *S. aureus* ATCC 29213.

### **3.6.2. *Preparación de los medios de cultivo***

Previo al test de actividad antibacteriana se preparó el medio de cultivo indispensable para el crecimiento de los microorganismos monitores.

#### **3.6.2.1. Agar Müller-Hinton (MH)**

El agar fue preparado a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La preparación se realizó en frascos de vidrio de 500 mL y se autoclavó. Inmediatamente después de esterilizar el medio nutritivo se dejó enfriar al ambiente hasta que se pueda soportar el frasco en la palma de la mano, luego se vertió el preparado en placas petri (25 mL – 30 mL, para placas de 100 mm de diámetro interno), de manera que el grosor del agar en la placa sea 4 mm según el INS 2002. Una vez preparado se dejó enfriar en el interior de la cámara de flujo laminar durante 15 minutos, después se envolvieron en bolsas de plástico y se mantuvieron en refrigeración de 2 a 8 °C hasta su empleo.

### **3.6.3. *Preparación de extractos***



Se cortó papel filtro Whatman número 1 en forma de discos de 6 mm de diámetro. Se prepararon y esterilizaron todos los materiales involucrados en el ensayo.

Se preparó una solución stock, con 1 mg de extracto o fracción y se añadió 100  $\mu$ L del sistema en el cual es soluble, a partir de esta solución madre se realizaron 7 diluciones seriadas del extracto a evaluar, se colocaron 5  $\mu$ L de cada dilución seriada de los extractos en discos de papel esterilizado, además como control negativo también se colocó 5  $\mu$ L de cada sistema en los discos. Finalmente, los discos embebidos de los extractos se llevaron a incubar a 30 °C durante 60 minutos.

### **3.6.4. Inoculación**

#### **3.6.4.1. Preparación del inóculo**

Previamente se realizaron las siguientes operaciones:

- ✓ Se reactivaron las cepas bacterianas en caldo MH y se incubaron toda la noche a 37 °C.
- ✓ Se estriaron las cepas bacterianas en agar MH y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.
- ✓ Se preparó previamente una solución de NaCl al 0,85% y se distribuyó 5 mL en tubos de vidrio con tapa rosca.

Se seleccionó 3 a 4 colonias del mismo tipo morfológico de un cultivo en placa y se tomó por medio de un asa de siembra y se transfirió a un tubo que contiene los 5 mL de solución salina, las colonias fueron colocadas hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0,5 de la escala de McFarland por comparación visual. Este procedimiento se realizó en presencia de un mechero de Bunsen o en el interior de una cámara de flujo laminar.

### 3.6.4.2. Inoculación de las placas

Dentro de los 10 minutos después del ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión preparada, y se roto el hisopo varias veces para remover el exceso del inóculo y se aplicó sobre la superficie seca de la placa de MH, se realizó un hisopado en 3 direcciones y se dejó secar al ambiente, por no más de 5 minutos antes de colocar los discos.

### 3.6.5. Ensayo de actividad antibacteriana

Los ensayos de actividad antibacteriana se llevaron a cabo por triplicado para cada extracto (inicial, fraccionado o purificado) frente a *S. aureus*, empleando el método de difusión en disco según Al-Hadhrami *et al.*, (2016) e INS (2002).

Se colocaron los discos impregnados de extracto a evaluar sobre la superficie del agar utilizando una pinza estéril, con ayuda de una plantilla y un marcador, presionando suavemente sobre cada disco para asegurar el contacto completo con la superficie del agar a la vez se colocaron los discos de control positivo (antibiótico) para *S. aureus* ATCC 29213: Trimetoprima 5 µg y de control negativo (sistemas de solventes en el cual es soluble el extracto), los discos se dejaron secar sobre el agar por 5 minutos en la cámara de flujo laminar, luego se incubaron las placas en posición invertida a 35°C durante 16 a 18 horas (INS, 2002). Posterior al tiempo de incubación se examinó cada placa y con una regla se midieron los diámetros de halos de inhibición de cada disco y se reportaron los promedios, en el Anexo 2 se muestra las imágenes experimentales de este ensayo.

### **3.7. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Se pesó 10 mg del componente separado y purificado de la muestra líquénica, se colocó en un vial de vidrio y se añadió 5 mL de solvente en el cual será evaluado, luego se empleó el rotavapor para secarlo durante 3 horas. Una vez seco se diluye con 2 mL del solvente deuterado, con el cual será evaluado, se coloca 0,5 mL de la sustancia preparada con ayuda de una jeringa en un tubo de RMN para ser posteriormente evaluado en el equipo.

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos se obtuvieron con el uso de solventes deuterados ( $\text{CDCl}_3$  y DMSO) mediante el Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance III HD-400, perteneciente a la Pontificia Universidad Católica de Chile.

### **3.8. Análisis por Espectrofotometría Ultravioleta – Visible (UV-VIS)**

Esta determinación se realizó usando el método espectrofotométrico UV-VIS. Se obtuvo la absorbancia máxima haciendo un scan entre 200 y 400 nm usando 0,1 ppm de ácido úsnico en cloroformo, se empleó el espectrofotómetro UV-VIS HeLIOS Y ThermoScientific, perteneciente al Laboratorio de Desarrollo e Investigación en Química Orgánica, UNMSM.

### **3.9. Análisis por Espectrometría Infrarroja (IR)**

Se tomó 2 mg de la sustancia a evaluar y se mezcló con 98 mg de KBr con ayuda de un mortero hasta obtener una mezcla sólida fina y uniforme, luego con ayuda de una prensa presión se formó una pastilla circular para ser evaluada por el espectrómetro IR Nicolet iS10

TermoScientific perteneciente al Laboratorio de Desarrollo e Investigación en Química Orgánica,  
UNMSM.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1. Aislamiento

En la Tabla 8, se muestra en resumen los datos experimentales reportados para los extractos iniciales, estos datos nos muestran que el mayor rendimiento en peso de extracto seco es para el extracto EM, sin embargo, este dio resultado negativo a la evaluación de actividad antibacteriana, en contraste los extractos ED y EA muestran resultado positivo a dicha evaluación.

**Tabla 8.** Datos experimentales de los extractos aislados.

Extracto	Peso (g)	Actividad Antibacteriana
<b>ED</b>	8,5	+
<b>EA</b>	6,3	+
<b>EM</b>	12,6	-

Siendo +: Resultado positivo a la evaluación de actividad antibacteriana.

### 4.2. Separación y purificación

En la Tabla 9, nos muestran que el mayor rendimiento en peso seco es para el compuesto C1, también se observa que todos los compuestos puros presentan actividad antibacteriana.

**Tabla 9.** Datos experimentales de los compuestos puros.

Compuesto	Peso (mg)	Actividad Antibacteriana
<b>C1</b>	1000,4	+
<b>C2</b>	20,2	+
<b>3.2 b</b>	15,3	+

Siendo +: Resultado positivo a la evaluación de actividad antibacteriana.

### 4.3. Marcha fitoquímica

Para 50 g de muestra molida y seca del liquen en estudio, se obtuvieron los siguientes resultados de la marcha fitoquímica, que se presentan en la Tabla 10.

Del extracto etanólico acuoso se realizaron las pruebas de identificación de flavonoides, taninos, saponinas y antraquinonas. La prueba con solución de  $\text{FeCl}_3$  1% mostró una coloración rojo sangre, la formación de esta coloración indica la presencia de fenoles (Ocho y Sarmiento, 2018), esta prueba se basa en el efecto quelante que poseen los grupos hidroxilos, presentes en la estructura de los compuestos fenólicos, que al ser ligandos bi- o multidentados presentan una mayor estabilidad sobre los cationes inorgánicos debido a la formación de anillos quelatos (Angulo y Beyer, 2010), entonces podemos afirmar que el liquen en estudio no presenta flavonoides ni taninos, ya que esta prueba de coloración no es específica, pues para el caso de flavonoides no dio positivo para la prueba de Shinoda, reacción característica que los identifica. Además, para la determinación de taninos es preciso que reflejen coloración verde o azul, la cual alude a taninos condensados o hidrolizables respectivamente.

Continuando con las pruebas de identificación de taninos, se realizó la prueba de gelatina-NaCl 10%, el cual dio positivo por la formación de un precipitado blanco, es muy probable que se deba a la presencia de polifenoles, ya que ocurre interacciones electrostáticas entre las diferentes partes de la proteína y los grupos hidroxilo o grupos ácidos fenólicos presente en compuestos fenólicos lo que provoca un equilibrio de cargas y como consecuencia sucede la precipitación de la proteína.

Del extracto etéreo se realizó una CCD, donde se observa que la especie en estudio es rica en esteroides ya que se observó manchas de coloración amarilla características de este análisis.

Además, con las pruebas de coloración para saponinas se confirmó la presencia de saponinas del tipo esteroidales pues ante el reactivo de Libermann – Burchard dio azul verdoso específico para estos compuestos. Finalmente, en el extracto metanólico se identificó cumarinas, ya que se observó con la lámpara UV a 365 nm una coloración tenue verde amarillento fluorescente, lo cual nos indica poca cantidad de estos compuestos.

Como parte de la secuencia de la marcha fitoquímica para la identificación de alcaloides, se realizó todo el procedimiento que indica la metodología de Lock de Ugaz, de esta forma a partir del extracto clorofórmico etanólico se realizaron las pruebas para identificar alcaloides: reactivo de Dragendorff, de Wagner y de Mayer, las cuales dieron resultado negativo.

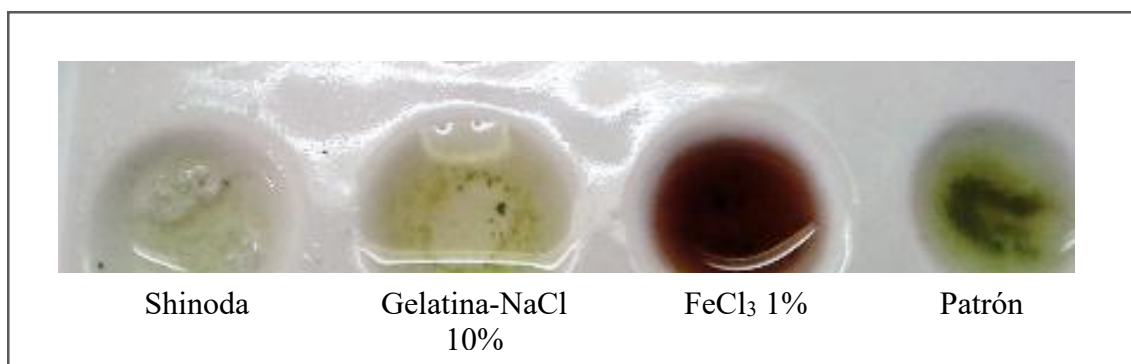
En forma cualitativa se identificó que el liquen en estudio posiblemente contiene compuestos fenólicos, esteroides, saponinas esteroidales en proporción abundante y cumarinas en poca cantidad, asimismo no contiene alcaloides, flavonoides, antraquinonas y taninos, en la Tabla 10 se encuentra el resumen general de toda la marcha fitoquímica y en las figuras 8 al 10, se muestran las pruebas cualitativas que en general dieron resultado positivo. Adicionalmente, hay estudios fitoquímicos de otras especies como *U. antarctica* muestran la existencia de compuestos fenólicos, taninos y azúcares reductores (Viteri, 2015), lo cual concuerda con nuestros resultados cualitativos a excepción de los taninos.

**Tabla 10.** Resultados de la marcha fitoquímica de la muestra sólida molida del liquen.

Metabolitos	Ensayo	Color	Resultados
<b>Alcaloides</b>	Reactivo de Dragendorff	pp negro	-
	Reactivo de Wagner	pp amarillo	-
	Reactivo de Mayer	amarillo	-
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	decoloración	-
	FeCl <sub>3</sub> 1%	rojo sangre	-
	NaOH 20%	amarillo	++
<b>Antraquinonas</b>	Borntrager	amarillo	-
<b>Taninos</b>	Gelatina - NaCl 10%	pp blanco	++
	FeCl <sub>3</sub> 1%	rojo sangre	-
<b>Saponinas</b>	Prueba de la espuma		++
	Reactivo de Salkowski	rojo sangre	+++
	Reactivo de variante A de Salkowski	azul-verdoso	+++
	Reactivo de Libermann-Burchard	verde claro	+++
<b>Esteroides</b>	Análisis de CCD	manchas coloreadas	+++
<b>Cumarinas</b>	Prueba de fluorescencia al UV	verde amarillento	+

Siendo: Presencia de metabolitos secundarios: +++ abundante, ++ moderado, + poco, - ausencia; pp: precipitado. Fuente: Elaboración propia.

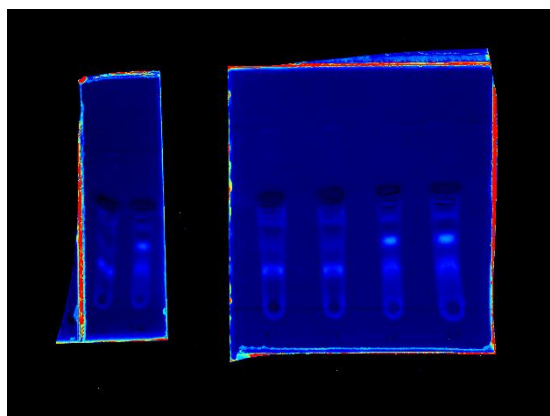




**Figura 8.** Identificación de compuestos fenólicos. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 9.** Identificación de saponinas terpénicas y esteroidales. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 10.** Identificación de Esteroles por CCD. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.4. Actividad antibacteriana

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación antibacteriana para los compuestos elucidados y de los extractos de los cuales provenían cada uno de ellos.

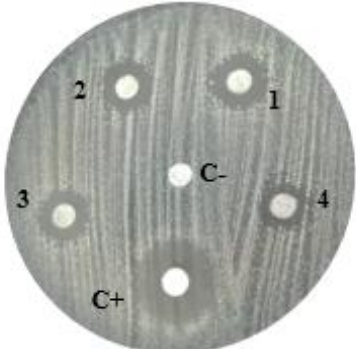
##### 4.4.1. Evaluación antibacteriana del compuesto C1

Se observa en la Tabla 11 los diámetros de los halos de inhibición que presenta el compuesto C1 en las concentraciones propuestas frente a la cepa *S. aureus* ATCC 29213.

Se evidencia un diámetro de halo de 14 mm a una concentración de 30  $\mu\text{g}$  y su % de inhibición es de 66,7%, conforme disminuye la concentración el poder inhibitorio bacteriano del compuesto C1 disminuye hasta 11 mm con un 52,4% de inhibición. Para la fracción ED 9 (fracción de donde proviene el compuesto C1 purificado) se observa que, a una concentración de 100  $\mu\text{g}$  se presenta un halo de 12,5 mm y para una concentración de 30  $\mu\text{g}$  tendría aproximadamente un halo alrededor de 11,5 mm con 59,5% y 54,8% de inhibición respectivamente, resultados menos favorables comparados con el compuesto C1 purificado, tal como se muestra en las Tablas 12 y 13. Entonces se puede decir que el compuesto purificado presenta un mayor efecto antibacteriano que cuando no lo estaba y que conforme disminuye la concentración del extracto ED 9 deja de mostrar halo de inhibición.

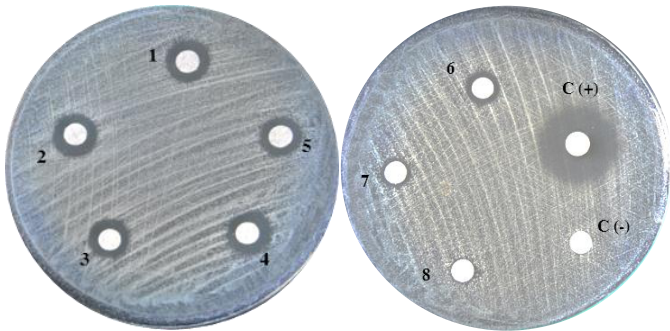
El control negativo no muestra halo inhibitorio, por lo que la actividad se le atribuye netamente al extracto o compuesto a evaluar; por otro lado, el control positivo (antibiótico) presenta halos dentro del rango establecido según los puntos de corte de CLSI (2017) y/o la EUCAST (2019) ver Anexo 3.

**Tabla 11.** Resultados de la prueba de AA del compuesto C1 frente a *S. aureus*.

Compuesto C1	N° Disco	Concent. (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)
	1	30	14
	2	15	13
	3	7,5	12
	4	3,8	11
	C (+)	5	21
	C (-)	30	NPH

Siendo C (+): Trimetoprima, C (-): Solvente, NPH: No presenta halo inhibitorio. Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 12.** Resultados de la prueba de AA de la fracción ED 9 frente a *S. aureus*.

Fracción ED 9	N° disco	Concent. (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)
	1	100	12,5
	2	50	12,5
	3	25	11,5
	4	12,5	11,5
	5	6,3	10,5
	6	3,1	9,5
	7	1,6	7,5
	8	0,8	NPH
	C(+)	5	21
	C (-)	100	NPH

Siendo: C (+): Trimetoprima, C (-): Solvente, NPH: No presenta halo inhibitorio. Fuente: Elaboración propia.

El criterio de aceptación para decir que la sustancia presenta actividad antibacteriana según Valgas *et al.*, (2007) es de un halo de inhibición > 9 mm. El compuesto C1 al exhibir un halo

inhibitorio entre 11 y 14 mm con % de inhibición desde 52,4% hasta 66,7 % evidencia un efecto antibacteriano, ver la Tabla 13.

**Tabla 13.** Relación entre la AA y % de inhibición para el compuesto C1 y fracción ED 9.

<b>Sustancia</b>	<b>Concentración µg/mL</b>	<b>% Inhibición</b>	<b>Actividad Antibacteriana (AA)</b>
<b>Compuesto C1</b>	30	66,7	SI
	15	61,9	SI
	7,5	57,1	SI
	3,8	52,4	SI
<b>Fracción ED 9</b>	100	59,5	SI
	50	59,5	SI
	25	54,8	SI
	12,5	54,8	SI
	6,3	50	SI
	3,1	45,2	SI
	1,6	35,7	NO
	0,8	0	NO

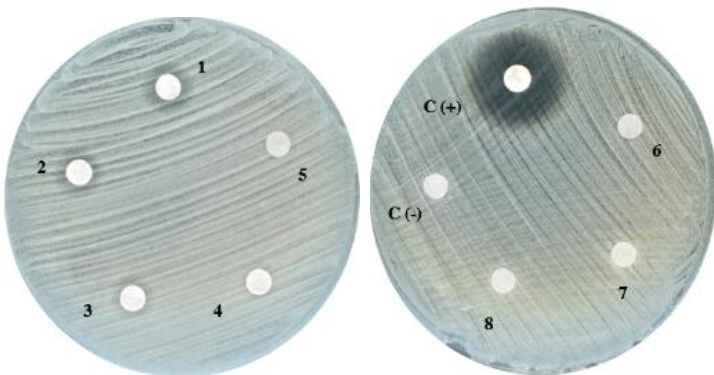
Fuente: Elaboración propia.

#### **4.4.2. Evaluación antibacteriana del compuesto C2**

En la Tabla 14 se observa para el compuesto C2 la formación de halos inhibitorios de 12, 10 y 9 mm solo para los discos numerados desde el 1 al 3 respectivamente, que presentan actividad según el criterio de aceptación. Comparando estos resultados con los del extracto EA 1 del cual provenía, se observa en la Tabla 15 que para el extracto EA 1 solo el disco 1 presentó halo y se encuentra en el valor mínimo dentro del rango para mostrar actividad. De esto se puede decir que, el compuesto C2 mejora su actividad en gran manera que cuando no estaba purificado.

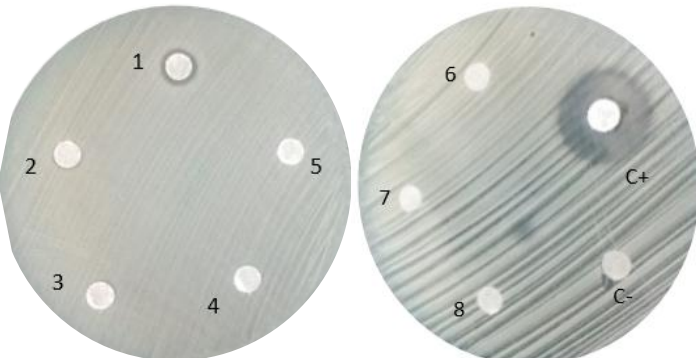
El control negativo no muestra halo inhibitorio, por lo que la actividad se le atribuye netamente al extracto o compuesto a evaluar, el control positivo (antibiótico) presenta halos dentro del rango establecido según los puntos de corte de CLSI (2017) y/o la EUCAST (2019).

**Tabla 14.** Resultados de la prueba de AA del compuesto C2 frente a *S. aureus*.

Compuesto C2		N° Disco	Concent. (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)
	1	100	12	
	2	50	10	
	3	25	9	
	4	12,5	7	
	5	6,3	NPH	
	6	3,1	NPH	
	7	1,6	NPH	
	8	0,8	NPH	
C (+)		5	21,5	
C (-)		100	NPH	

Siendo: C (+): Trimetoprima, C (-): Solvente, NPH: No presenta halo inhibitorio. Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 15.** Resultados de la prueba de AA del extracto EA 1 frente a *S. aureus*.

Fracción EA 1		Nº Disco	Concent. (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)
	1	100	9	
	2	50	NPH	
	3	25	NPH	
	4	12,5	NPH	
	5	6,3	NPH	
	6	3,1	NPH	
	7	1,6	NPH	
	8	0,8	NPH	
	C(+)	5	21,5	
	C (-)	100	NPH	

Siendo: C (+): Trimetoprima, C (-): Solvente, NPH: No presenta halo inhibitorio. Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 16 se observa valores de % de inhibición altos para el compuesto C2 comparados con el extracto EA 1 y de acuerdo con los resultados mostrados se considera aceptable al compuesto C2 como potencial bioactivo ya que cumple con los criterios para ser considerado como tal.

**Tabla 16.** Resultados de la AA y % de inhibición para el compuesto C2 y fracción EA 1.

<b>Sustancia</b>	<b>Concentración µg</b>	<b>% Inhibición</b>	<b>Actividad Antibacteriana (AA)</b>
<b>Compuesto C2</b>	100	55,8	SI
	50	46,5	SI
	25	41,9	SI
	12,5	32,6	NO
	6,3	0	NO
	3,1	0	NO
	1,6	0	NO
	0,8	0	NO
<b>Fracción EA 1</b>	100	41,9	SI
	50	0	NO
	25	0	NO
	12,5	0	NO
	6,3	0	NO
	3,1	0	NO
	1,6	0	NO
	0,8	0	NO

Fuente: Elaboración propia.

#### **4.4.3. Evaluación antibacteriana del compuesto 3.2 b**

En la Tabla 17 se observa los halos de inhibición que presenta el compuesto 3.2 b para todas las concentraciones propuestas frente a la cepa *S. aureus* ATCC 29213. Se tiene que para los

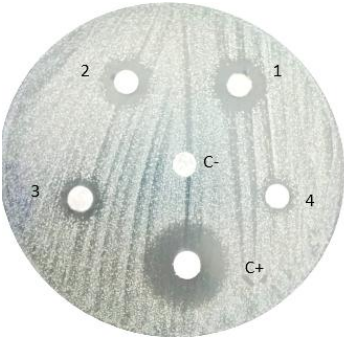
discos 1 y 2 se encuentran los mayores halos de 14 y 13 mm, respectivamente, y para los discos 3 y 4 de 11 y 9 mm, respectivamente, todas las concentraciones evaluadas cumplen con el criterio de aceptación para una sustancia con actividad antibacteriana, entonces decimos que el compuesto 3.2 b tiene actividad antibacteriana.

Comparando estos resultados con los resultados de la subfracción A (subfracción de donde provenía el compuesto 3.2 b) que se muestran en la Tabla 18, se observa que, para los discos del 1 al 4 presentó halo inhibitorio, pero solo para los tres primeros discos se puede decir que presenta actividad.

Se puede decir que el compuesto 3.2 b puro presenta mejor potencial antibacteriano pues hasta con 3,8 µg exhibe comportamiento antibacteriano según los criterios de aceptación mencionados anteriormente; además, también en la Tabla 19 se puede observar que el compuesto 3.2 b exhibe porcentajes de inhibición más altos comparados con los de la subfracción A, incluso a concentraciones mucho más bajas.

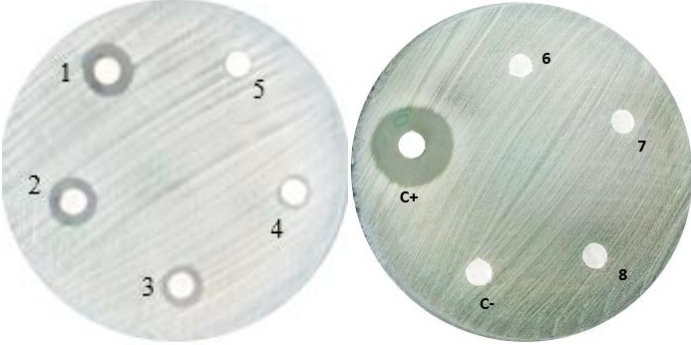
El control negativo no muestra halo inhibitorio, por lo que la actividad se le atribuye netamente al extracto o compuesto a evaluar, el control positivo (antibiótico) presenta halos dentro del rango establecido según los puntos de corte de CLSI (2017) y/o la EUCAST (2019).

**Tabla 17.** Resultados de la prueba de AA del compuesto 3.2 b frente a *S. aureus*

Compuesto 3.2 b	N° Disco	Concent. (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)
	1	30	14
	2	15	13
	3	7,5	11
	4	3,8	9
	C (+)	5	21
	C (-)	30	NPH

Siendo: C (+): Trimetoprima, C (-): Solvente, NPH: No presenta halo inhibitorio Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 18.** Resultados de la prueba de AA de la subfracción A frente a *S. aureus*

Subfracción A	N° Disco	Concent. (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)
	1	100	12
	2	50	10,5
	3	25	9
	4	12,5	7,5
	5	6,3	NPH
	6	3,1	NPH
	7	1,6	NPH
	8	0,8	NPH
	C (+)	5	21
	C (-)	100	NPH

Siendo: C (+): Trimetoprima, C (-): Solvente, NPH: No presenta halo inhibitorio. Fuente: Elaboración propia.



**Tabla 19.** Resultados de la AA y % de inhibición para el compuesto 3.2 b y subfracción A

Sustancia	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inhibición	Actividad Antibacteriana (AA)
<b>Compuesto 3.2 b</b>	30	66,7	SI
	15	61,9	SI
	7,5	52,4	SI
	3,8	42,9	SI
<b>Subfracción A</b>	100	57,1	SI
	50	50	SI
	25	42,9	SI
	12,5	35,7	NO
	6,3	0	NO
	3,1	0	NO
	1,6	0	NO
	0,8	0	NO

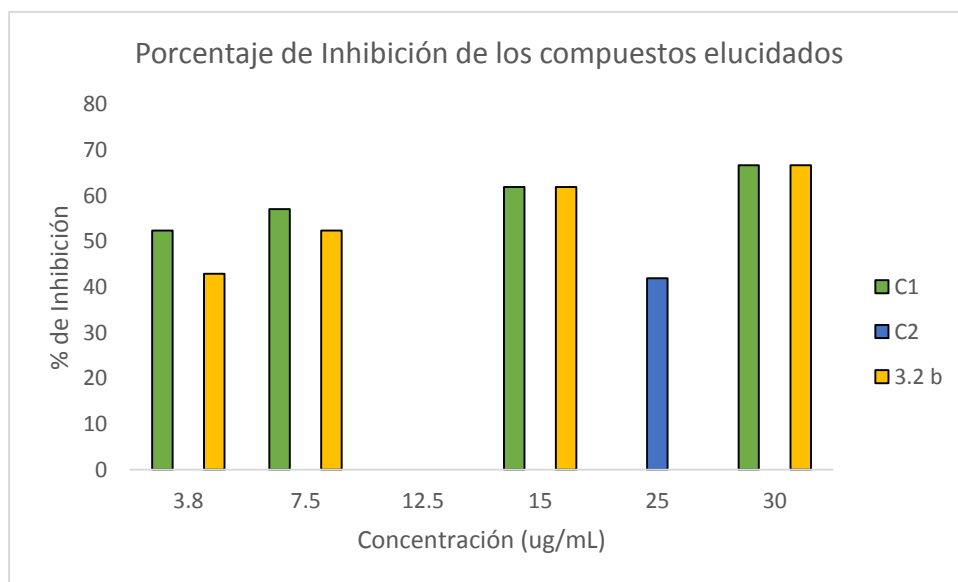
Fuente: Elaboración propia.

Estudios realizados en Cuba por Martínez *et al.* (2016) en los extractos de la especie líquénica *Peltigera laciniata* (Merrill ex Riddle) Gyeln frente a *S. aureus* muestran halos de inhibición de extracto crudo (8,4 mm), alcaloides totales (9,7 mm) y fracción (10,3mm), fueron evaluados a concentraciones entre 250 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Al comparar estos resultados con los halos de inhibición del compuesto C1 (14 mm), compuesto C2 (12 mm), compuesto 3.2 b (14 mm) evaluados entre 30 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , es evidente que los metabolitos presentes en *U. aurantiaco-atra* muestran un mayor efecto antibacterial frente a *S. aureus*, siendo promisoría para futuras investigaciones.

Ramírez *et al.* (2007) determinaron la actividad antibacterial de los extractos y fracciones etanólicas de las raíces, hojas y espigas del *Rumex conglomeratus* contra *S. aureus* ATCC 25923, las pruebas muestran actividades inhibitorias hasta el 68% a 500  $\mu\text{g/mL}$  de extracto en diclorometano de espigas, lo cual puede sugerir una buena fuente de productos potenciales como

antibacterianos frente a microorganismos Gram positivos, sin embargo, los compuestos elucidados en nuestro estudio presentan actividades inhibitorias desde 55,9 a 66,7% evaluadas a concentraciones no mayores de 100  $\mu\text{g/mL}$ , sugiriendo que los compuestos activos presentes en *U. aurantiaco-atra* son un valioso potencial antibacteriano.

De acuerdo a los resultados se propone que el compuesto C1 y compuesto 3.2 b, pueden ser considerados como potenciales compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas frente a *S. aureus*, debido a que a concentraciones a partir de 3,8  $\mu\text{g}$  para los compuestos C1 y 3.2 b muestran actividad y porcentajes de inhibición altos en el ensayo de actividad antibacteriana; sin embargo, cabe resaltar que el compuesto C2 también podría ser considerado, pero a partir de concentraciones de 25  $\mu\text{g}$ , tal como se muestra gráficamente en la Figura 11.



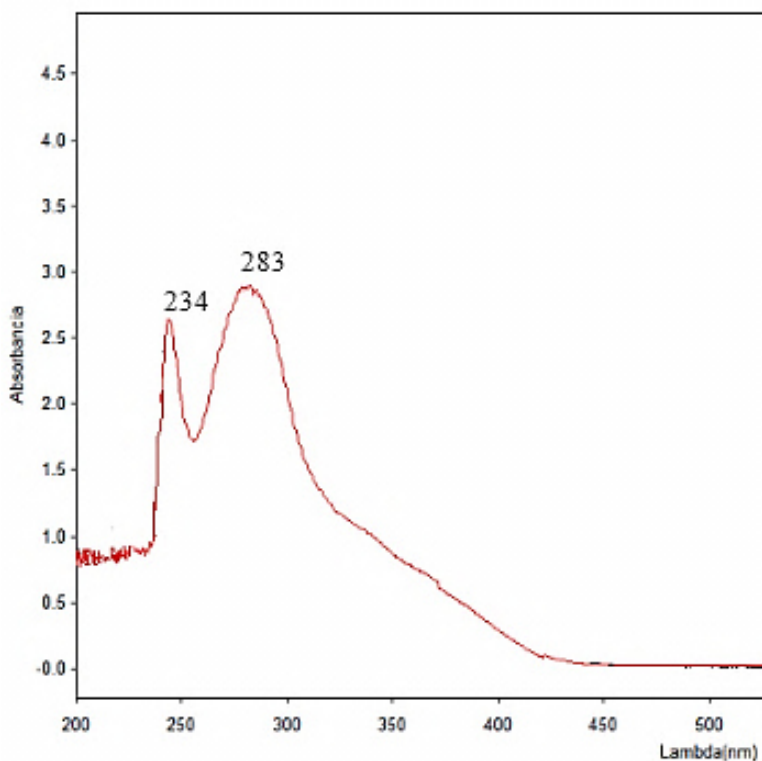
**Figura 11.** Porcentaje de inhibición de los compuestos elucidados. Fuente: Elaboración propia

#### 4.5. Elucidación estructural

#### 4.5.1. Elucidación de la estructura del compuesto C1

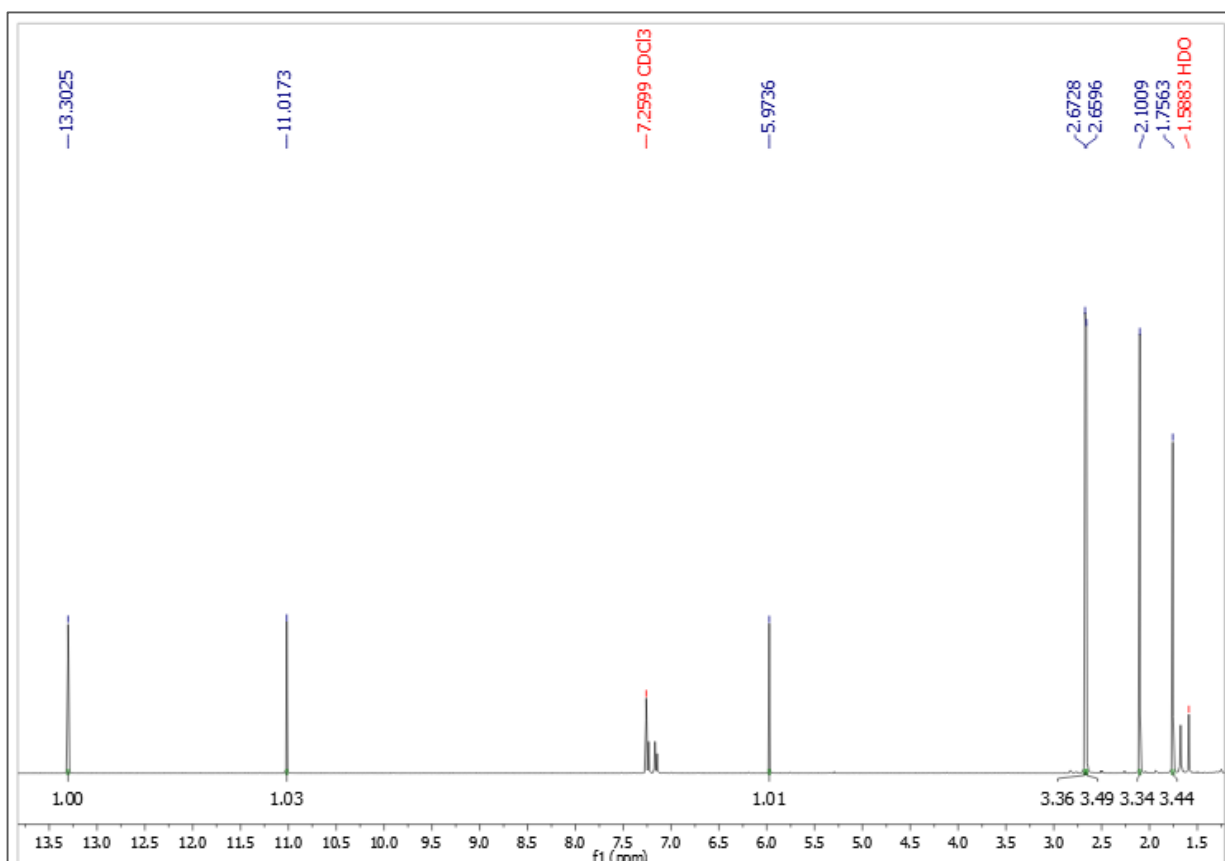
El compuesto C1 es un sólido de color amarillo en forma de agujas, soluble en cloroformo, parcialmente soluble en acetona y poco soluble en metanol, tiene un punto de fusión a 202 – 204°C.

Sus longitudes de onda máximas en el espectro UV-VIS en cloroformo (Figura 12), son: 234 y 283 nm, bastante cercanas a los valores 234 y 284 nm, reportados para el del ácido úsnico (Calla, 2018).



**Figura 12.** Espectro UV del extracto clorofórmico del compuesto C1. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 13 se observa el espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto C1 el cual fue evaluado en el solvente deuterado  $\text{CDCl}_3$  y medido a una frecuencia de 400 MHz. A campo alto (desplazamiento menor) se pueden identificar los protones más protegidos del grupo  $-\text{CH}_3$  como singuletes a 1,7563 y 2,109 ppm; éste último presenta un desplazamiento ligeramente mayor por estar unido a un anillo aromático. También, hay dos grupos metóxilos de señales singuletes a 2,6696 y 2,6728 ppm, de igual manera el desplazamiento mayor corresponde al que está unido al anillo aromático, además se observa el singulete para un protón a 5,9736 ppm ocurre a un campo intermedio por el entorno de doble enlace  $=\text{CH}$ . Analizando el espectro a campo bajo se observan los singuletes en un ambiente menos protegido por la presencia del átomo oxígeno altamente electronegativo y el anillo aromático para los hidrógenos del grupo OH a 11,0173 y 13,3025 ppm, ésta última señal muestra tal desplazamiento porque se encuentra en un entorno que presenta una alta densidad electrónica.



**Figura 13.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto C1 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz. Fuente: Elaboración propia.

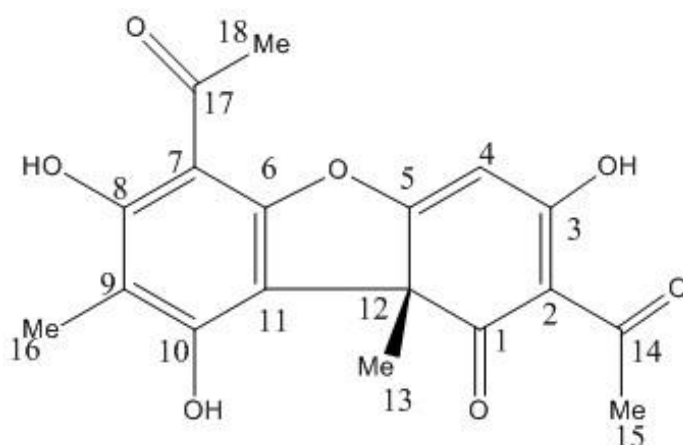
En la Tabla 20, se muestra la comparación del desplazamiento químico experimental del compuesto C1 con los datos que indica la referencia para el ácido úsnico (Huneck, 1996; Zelada y Pastor De Abram, 2012; Castro, 2016). En el espectro experimental no se distingue la señal alrededor de 18 ppm, pues la medición se realizó a un rango menor, caso similar a la referencia reportada por Castro (2016), a pesar de ello se observa que los valores de las demás señales son muy cercanos.

**Tabla 20.** Comparación del espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto C1 y del ácido úsnico.

Desplazamiento $\delta$ (ppm)				Descripción
Compuesto C1	Ácido úsnico			
	Huneck	Zelada	Castro	
1,7563	1,75	1,77	1,7647	3H, s, Me-13
2,1009	2,10	2,10	2,1133	3H, s, Me-16
2,6596	2,66	2,67	2,6653	3H, s, -OMe-15
2,6728	2,67	2,68	2,6855	3H, s, -Ome-18
5,9736	5,92	5,99	5,9859	1H, s, H4
11,0173	11,02	11,03	11,0485	3H, s, C <sub>10</sub> -OH
13,3025	13,31	13,31	13,3309	3H, s, C <sub>8</sub> -OH
-	18,84	18,85	-	3H, s, C <sub>3</sub> -OH

Nota: Datos teóricos para el ácido úsnico, reportados de Huneck, S. (1996), Zelada y Pastor De Abram, (2012) y Castro (2016) condiciones de medición: 400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz  $\text{CDCl}_3$  respectivamente. Fuente: Elaboración propia.

Además analizando los valores de ángulo de rotación de otras especies del género *Usnea* se tiene para la *U. antarctica* un ángulo de rotación de  $[\alpha]_{546}^{25} = +445$  (c, 298,  $\text{CHCl}_3$ ) (Viteri, 2015) y para *U. durietzii* MOT  $[\alpha]_{546}^{25} = +500$  (Zelada y Pastor De Abram, 2012) estas características indican que el compuesto C1 por ser de la misma especie, muy probablemente sea de configuración R y giro dextrógiro. Con todas estas características físicoquímicas y los datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y UV, se propone que el compuesto C1 sería el (+) R-ácido úsnico, cuya estructura se encuentra en la Figura 14.

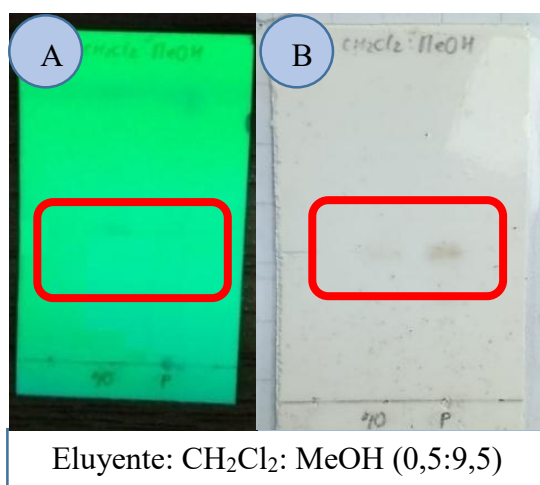


**Figura 14.** Estructura química propuesta para el compuesto C1. Fuente: Elaboración propia.

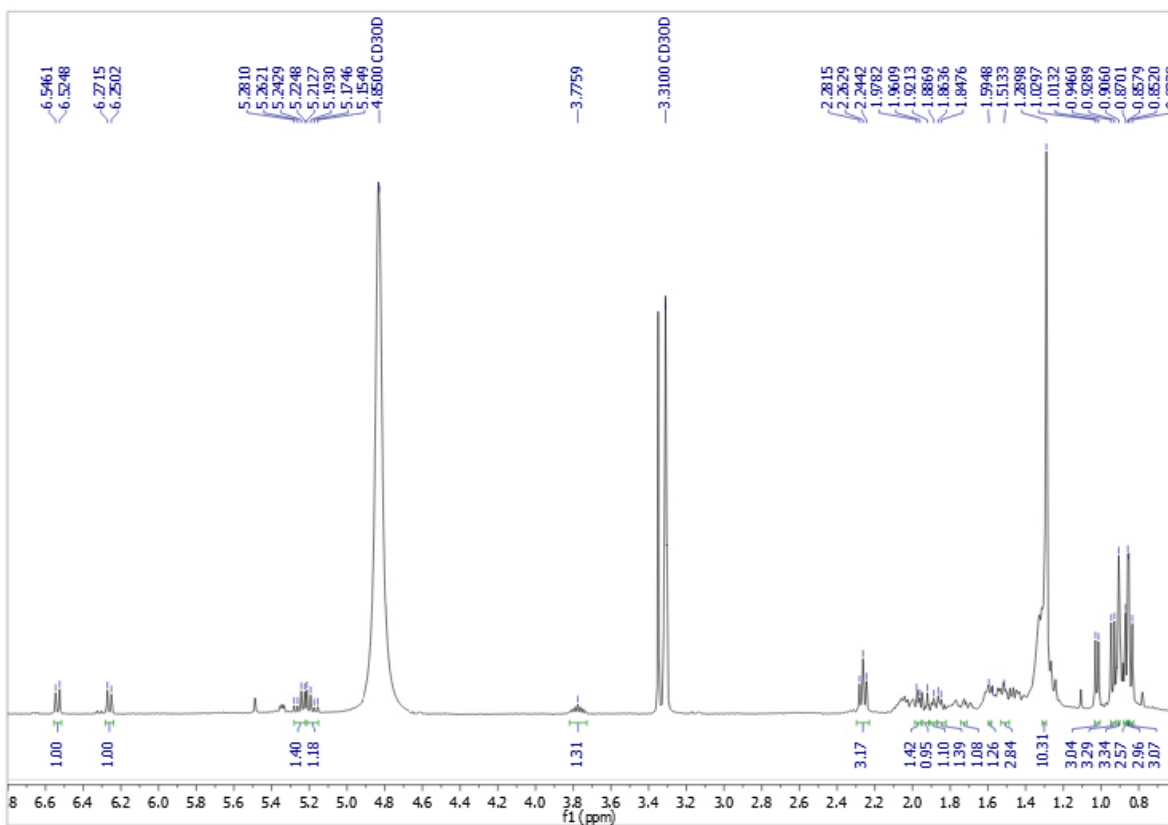
#### 4.5.2. Elucidación de la estructura del compuesto C2

El compuesto C2 es un sólido blanco cristalino soluble en metanol y en cloroformo, se realizó el análisis de CCD en el sistema de elución de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (0,5:9,5), en el cromatograma se observó una mancha oscura, característica de peróxidos, visualizada con luz UV a 254 - 365 nm, luego se empleó como revelador una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$  10%, la mancha se intensificó después de ser sometida a vapores de calor de aproximadamente  $100^\circ\text{C}$  durante 20 segundos, cuyo  $R_f = 0,41$  cm que comparada con el patrón de peróxido de ergosterol mostraron el mismo desplazamiento cromatográfico, en el la Figura 15 se muestra la imagen de este análisis.

En la Figura 16 se observa el espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto C2 evaluado en el solvente deuterado  $\text{CD}_3\text{OD}$ , medido a una frecuencia de 400 MHz, que integra para un total de 45 hidrógenos.



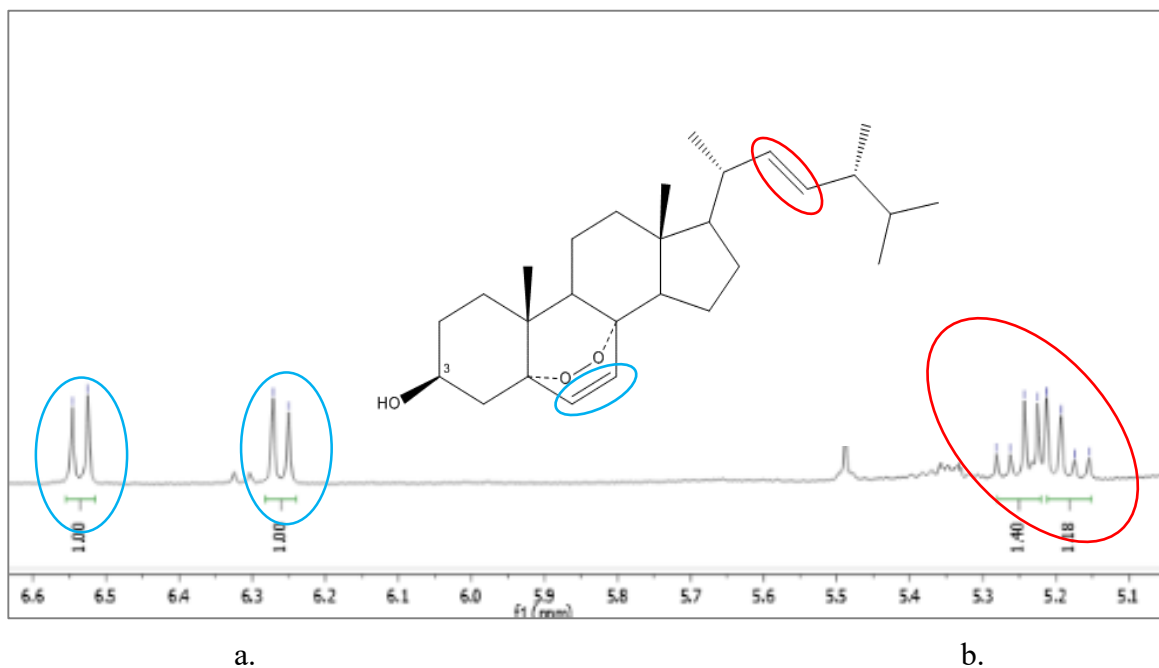
**Figura 15.** Cromatogramas A y B del compuesto C2, expuesto a la luz UV y visible.  
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 16.** Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto C2 en CD<sub>3</sub>DO a 400 MHz. Fuente: Elaboración propia.

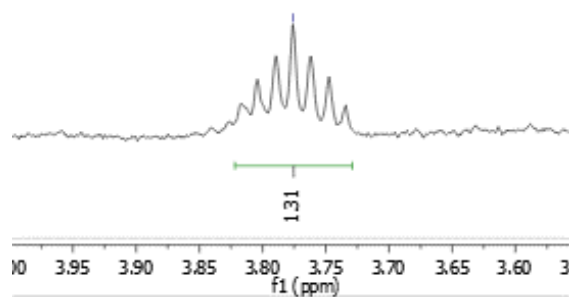


El espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto C2 mostró la presencia de dos olefinas di sustituidas que es característico de un derivado de ergosterol. En la ampliación Figura 17 a se observan las señales de los protones que se atribuyen a enlaces dobles, a campo bajo se puede identificar la primera señal doblete para un protón a 6,5354 ppm, acoplado con el hidrogeno del carbono adyacente, que también muestra una señal doblete a 6,2609 ppm por la forma de sus señales podría tratarse de los hidrógenos que conforman el doble enlace en posición cis, pertenecientes al sistema A-B del anillo B, su desplazamiento se debe a que son los protones más desprotegidos, además de ser desapantallados por el doble enlace también son los más cercanos al radical superóxido, en la Figura 17 b se observa dos señales doblete de doblete a 5,2529 ppm y 5,1838 ppm que se atribuyen a dos hidrógenos acoplados, éstos hidrógenos por estar más alejados del radical superóxido, aparecen a un desplazamiento menor, por la cercanía de sus señales y por la orientación en su forma, se les atribuye a los hidrógenos olefinicos de carbonos adyacentes en posición trans.



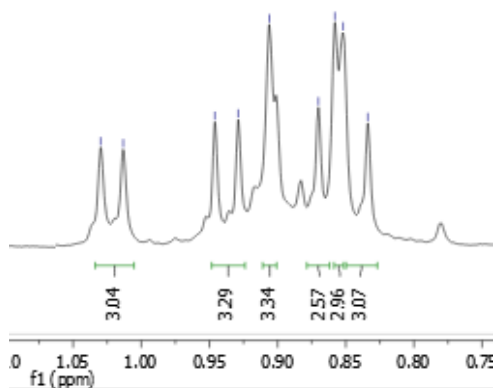
**Figura 17.** Ampliación I del espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto C2. Fuente: Elaboración propia.

A campo intermedio se tiene la señal multiplete a 3,7759 ppm, que se observa en la Figura 18. Debido a la presencia de varios hidrógenos acoplados, por lo que se atribuye esta señal al hidrógeno unido al carbono en posición 3 que también está unido a un grupo OH, Lobato (2017) afirma: “Por la anchura de la señal, indica que el grupo hidroxilo se encuentra dispuesto estereoquímicamente  $\beta$ -ecuatorial”.



**Figura 18.** Ampliación II, señal multiplete del espectro RMN  $^1\text{H}$ . Fuente: Elaboración propia.

A campo alto se encuentran las señales para los hidrógenos más protegidos, los cuales se atribuyen a cuatro señales doblete debido a los grupos metilo secundarios en 1,0214 ppm, 0,9374 ppm, 0,8670 ppm, 0,8338 y dos señales singuletes de grupos metilo terciarios a 0,9060 ppm y 0,8550 ppm, integrando cada señal para 3 hidrógenos (ver Figura 19).



**Figura 19.** Ampliación III, señal de metilos en el espectro RMN  $^1\text{H}$ . Fuente: Elaboración propia.

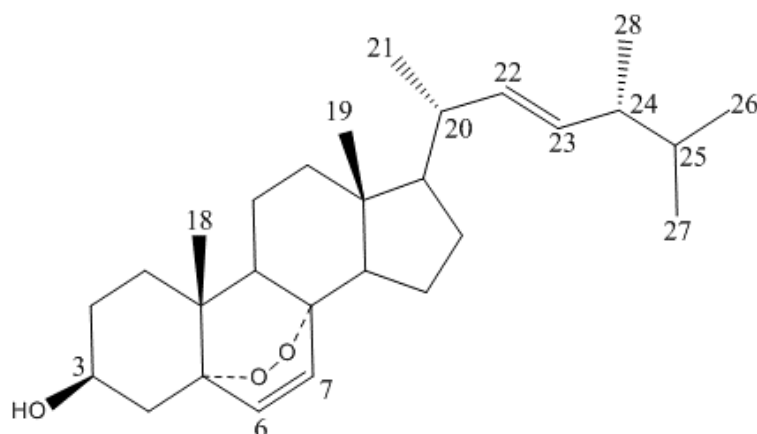
Por lo mencionado anteriormente, el compuesto C2 se trataría del peróxido de ergosterol, en base al mismo desplazamiento en el análisis de CCD entre el compuesto C2 y el estándar de peróxido de ergosterol, es por ello que se realiza la comparación de los datos espectroscópicos RMN  $^1\text{H}$ , los cuales se encuentran en la Tabla 21, en donde se observa la comparación del desplazamiento químico experimental del compuesto C2 con los datos teóricos para el peróxido de ergosterol reportados por Krzyczkowski *et al.* (2009) y Albornoz (2019), se observan valores cercanos correspondientes al entorno químico que se propone.

**Tabla 21.** Comparación del espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto C2 y del peróxido de ergosterol.

Desplazamiento $\delta$ (ppm)			Descripción
Compuesto C2	Peróxido de ergosterol		
	Krzyczkowski	Albornoz	
0,8338	0,82	0,83	3H, d, Me-26
0,8550	0,82	0,85	3H, s, Me-18
0,8701	0,83	0,86	3H, d, Me-27
0,9060	0,89	0,91	3H, s, Me-19
0,9374	0,91	0,94	3H, d, Me-28
1,0214	100	1,02	3H, d, Me-21
3,7759	3,97	3,78	1H, m, H-3
5,1838	5,15	5,21	1H, dd, C <sub>23</sub>
5,2529	5,22	5,24	1H, dd, C <sub>22</sub>
6,2609	6,3	6,26	1H, m, C <sub>6</sub>
6,5354	6,50	6,54	1H, m, C <sub>7</sub>

Nota: Datos teóricos para el peróxido de ergosterol, reportados en Krzyczkowski *et al.* (2009) y Albornoz (2019) condiciones de medición: 500 MHz en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$  respectivamente. Fuente: Elaboración propia

Con las características fisicoquímicas, la comparación de Rf con una muestra auténtica del peróxido de ergosterol con el compuesto C2 y los datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$ , se propone que el compuesto C2 sería el peróxido de ergosterol cuya estructura se encuentra en la Figura 20.



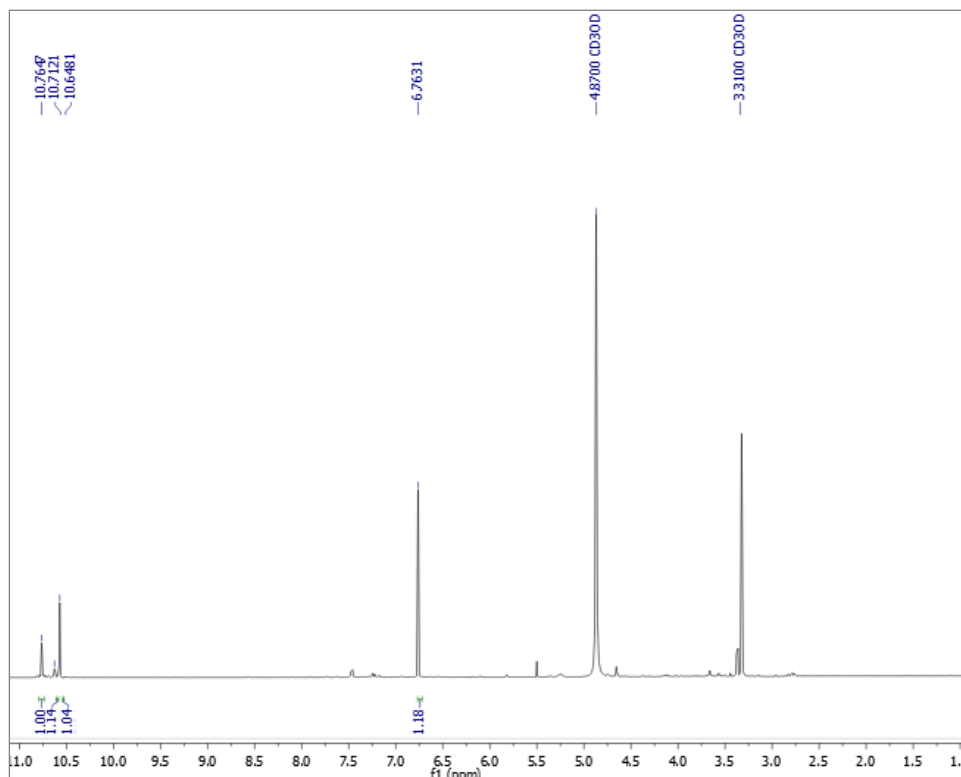
**Figura 20.** Estructura química propuesta para el compuesto C2. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.5.3. Elucidación de la estructura del compuesto 3.2 b

El compuesto 3.2 b es un sólido de color crema, soluble en metanol y parcialmente en cloroformo.

En la Figura 21 se observa el espectro RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto 3.2 b evaluado en el solvente deuterado  $\text{CD}_3\text{OD}$  medido a una frecuencia de 400 MHz (Tabla 22), en el espectro RMN  $^1\text{H}$  se observó 4 señales singuletes que se asignaron de la siguiente manera, a campo intermedio en  $\delta = 6,7631$  ppm se tiene una única señal característica de un hidrogeno aromático, esto indica que la base de la estructura es un anillo aromático en el cual las demás posiciones se encuentran ocupadas, también se observan las señales en 10,6481 ppm, 10,7121 ppm y 10,7647 ppm, que por su desplazamiento se les atribuye a hidrógenos altamente desprotegidos tanto por el entorno aromático como por un átomo electronegativo, por esto se les atribuye a los grupos hidroxilos que se encuentran formando puentes de hidrógeno intramoleculares con grupos carbonilo en su entorno, que por estar desprotegidos se encuentran a desplazamientos mayores. En el espectro

RMN  $^1\text{H}$  no se distingue la señal de los hidrógenos de los grupos carbonilo, pues la medición se realizó a un rango menor y este tipo de señales se observan a desplazamientos mayores.



**Figura 21.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 3.2 b en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 400 MHz. Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 22 se observa el desplazamiento químico tentativo para el compuesto 3.2 b, donde solo se observan cuatro señales que se le atribuyen al único hidrogeno aromático y las restantes corresponderían a los tres grupos hidroxilos.

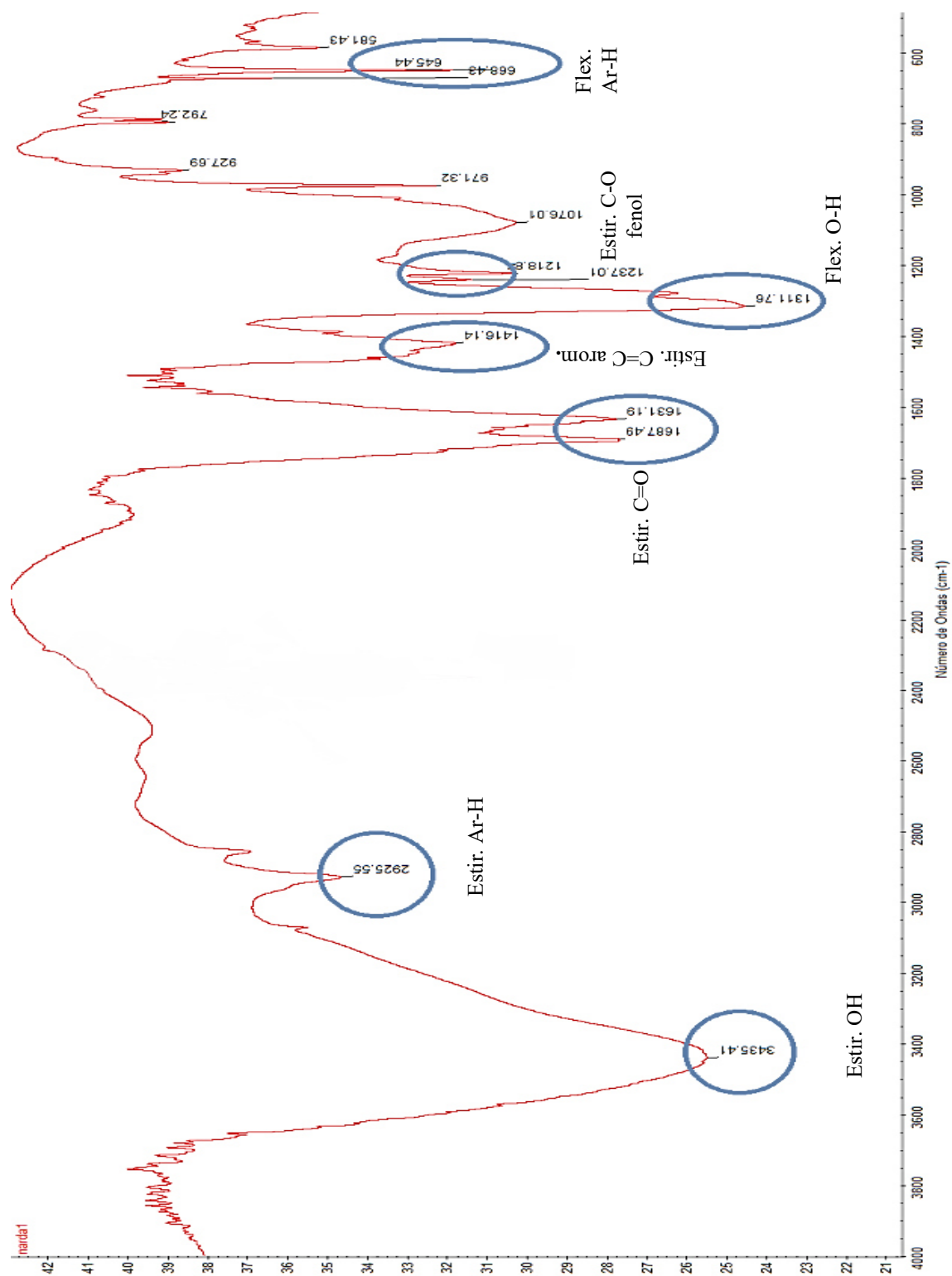
**Tabla 22.** Desplazamiento químico del compuesto 3.2 b

<b>Compuesto 3.2 b</b>	<b>Descripción</b>
<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	
6,7631	1H, s, Ar-H6
10,6481	1H, s, C <sub>3</sub> -OH
10,7121	1H, s, C <sub>5</sub> -OH
10,7647	1H, s, C <sub>6</sub> -OH

Nota: Condiciones de medición: 400 MHz en CD<sub>3</sub>OD Fuente: Elaboración propia.

En vista de que no se ha podido encontrar referencias de datos espectroscópicos RMN <sup>1</sup>H para la comparación y posterior elucidación del compuesto 3.2 b, así como corroborar la presencia de los dos grupos de ácidos carboxílicos que se presume, se recurrió a la espectroscopia IR, para hacer una verificación y comprobación de los grupos funcionales que se predicen en este compuesto.

En la Figura 22 se observa el espectro IR (KBr) para el compuesto 3.2 b, donde se pueden identificar las siguientes señales de absorción, ver Tabla 23. Se observa una señal de estiramiento C=C aromático a 1416,14 cm<sup>-1</sup> y una pequeña señal del estiramiento Ar-H alrededor de 2925,55 cm<sup>-1</sup> además de la señal de flexión por parte de Ar-H a 668,43 cm<sup>-1</sup> demostrando así la presencia del anillo aromático en el compuesto 3.2 b. Se encuentra una banda de absorción ancha e intensa, por la presencia de varios grupos OH (3), debido al estiramiento característico O-H a 3435,41 cm<sup>-1</sup> además por ser señales de un alcohol aromático se observa el movimiento de flexión O-H a 1311,76 cm<sup>-1</sup> y una señal característica por estiramientos C-O en fenoles entre 1218,84 cm<sup>-1</sup> y 1237,01 cm<sup>-1</sup>. Por último, se observa una señal con una banda de absorción intensa con doble pico a 1631,19 cm<sup>-1</sup> y 1687,49 cm<sup>-1</sup> por la presencia de los estiramientos C=O de dos grupos carbonilos, este desplazamiento de los sobretonos podría inferirse que los grupos carbonilos se encuentran en posición para (p-).



**Figura 22.** Espectro IR (KBr) del compuesto 3.2 b. Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 23.** Región de frecuencia y características para el espectro IR del compuesto 3.2 b.

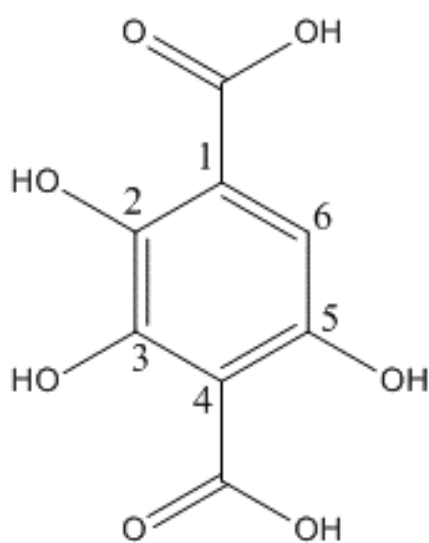
Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional
3435,41	O-H, Estiramiento
2925,55	Ar-H, Estiramiento
1631,19 – 1687,49	C=O, Estiramiento
1416,14	C=C Estir. aromático
1218,84 y 1237,01	C-O, Estir. en fenol
668,43	Ar-H, Flexión

Fuente: Elaboración propia.

Debido a la escasa bibliografía de la estructura que se propone para el compuesto 3.2 b, cabe señalar que en los reportes de Hatjimanoli *et al.* (1988) identificaron y elucidaron el ácido 2,5-dihidroxitereftálico, aislado en los extractos metanólicos de las raíces de la especie *Centaurium erybracea* Rafn, además señalan que este tipo de ácidos fenólicos se encuentran en otras plantas gentianaceous, la información fue de apoyo en la elucidación que proponemos para la estructura del compuesto 3.2 b.

Con todas las características físicas y los datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H e IR se propone tentativamente, que el compuesto 3.2 b podría ser el ácido 2,3,5-trihidroxitereftálico cuya estructura se propone en la Figura 23.





**Figura 23.** Estructura química propuesta para el compuesto 3.2 b. Fuente: Elaboración propia.

## CAPÍTULO V

### 5.1. Conclusiones

- Los compuestos analizados en *U. aurantiaco-atra* corresponden a estructuras esteroidales y estructuras que presentan unidades fenólicas, por ejemplo, el compuesto C1 pertenece a la categoría de ácidos úsnicos, su estructura presenta anillos bencénicos y grupos hidroxilo; el compuesto C2 pertenece a la categoría de esteroides y finalmente el compuesto 3.2 b corresponde a la categoría de derivados de ácidos benzoicos. Esto es en concordancia con los grupos de metabolitos secundarios que se habían determinado en la marcha fitoquímica.
- Los compuestos C1 y 3.2 b separados y purificados, muestran un mejor efecto inhibitorio frente a la proliferación bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 que el compuesto C2. El compuesto C1 muestra actividad a partir de la concentración de 3,8 µg reflejando un 52,4% de inhibición, mejorando el resultado a una concentración de 30 µg muestra 66,7% de inhibición; para el compuesto 3.2 b, se tiene que a partir de 3,8 µg presenta un 42,9% de inhibición que mejora al ser evaluado a 30 µg con un 66,7% de inhibición; mientras que, para el compuesto C2, se tiene efecto positivo recién a una concentración de 25 µg, este comportamiento mejora ante la concentración de 100 µg desde un 41,9% a 55,8% de inhibición.
- Se determinó que la estructura química del compuesto C1 aislado, corresponde al: (+) R-ácido úsnico; la estructura química del compuesto C2 aislado, corresponde al peróxido de ergosterol y finalmente se propone tentativamente que la estructura química del compuesto 3.2 b aislado, podría ser ácido 2,3,5-trihidroxitereftálico.

## 5.2. Recomendaciones

- ✓ En la concentración o tratamientos de los extractos mediante calor es importante no exceder en lo posible, temperaturas mayores de 40 °C, ya que esto puede contribuir en la pérdida de ciertos compuestos volátiles o termosensibles.
- ✓ La implementación de empacado de columna se debe realizar de preferencia al final del día, para que la fase estacionaria se amolde adecuadamente a la columna, evitando así la formación de burbujas o aire que impiden el óptimo desarrollo de separación del proceso cromatográfico.
- ✓ En la determinación de actividad antibacteriana es importante trabajar con los protocolos de bioseguridad, tener cuidado en los procedimientos, contaminantes biológicos y en el descarte de estos últimos.
- ✓ Es óptimo emplear sustancias prometedoras provenientes de la Antártida y darles un nuevo propósito, debido a que se requieren de antibacterianos que tengan un mecanismo de acción inhibitoria diferente y no se genere la aparición de resistencia, también es importante recalcar que estas sustancias liquénicas provienen de fuente natural y nueva, por lo tanto hay una gran posibilidad que otras bacterias enfrentadas a estos compuestos se vean afectadas considerablemente y no generen resistencia a estos, por lo que se incita además a realizar posteriores estudios de estos metabolitos secundarios hallados frente a otros microorganismos y evaluar su potencialidad como antiproliferativo de estos.
- ✓ Interrelacionar proyectos interdisciplinarios con biología molecular, farmacología y medicina, y considerar la optimización de los productos naturales.
- ✓ Se invita a promover información para concientizar y racionalizar el uso de los antibióticos.

## CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

- Al-Hadhrami, R. M. S., Al Muniri, R. M. S., Hossain M. A. (2016). Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of polar solvent extracts from leaves of *Ammi majus* used by the Omanis. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, 18(1): 62-65, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405882316300588?via%3Dihub>
- Angulo J. y Beyer L. (2010). *Química de Coordinación*. Universidad Nacional de Ingeniería.
- Albornoz, L. (2019). Estudio químico y metabolómico de los metabolitos secundarios presentes en los líquenes *Ramalina celastri*, *Punctelia rudecta* y *Sticta species* por HPLC-MS/MS en Tándem (Tesis de maestría). Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Araujo, E. (2015). Sistemática integrada del género *Usnea* Dill. Ex Adans. (*Parmeliaceae*) en la Península Ibérica (Tesis de pregrado). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Barrales, H., Reyes, C., Díaz, M., Sánchez, L., Cortés, J., Gómez de Jesús, A., y López, L. (2017). Importancia de los líquenes como bioindicadores ambientales y fuente promisoría de compuestos anticáncer. *Agroproductividad*, 10(10), 85–90.
- Barreno, E., y Perez-Ortega, S. (2003). Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias. España: KRK Ediciones. [https://www.uv.es/barreno/Liquenes\\_Muniellos.pdf](https://www.uv.es/barreno/Liquenes_Muniellos.pdf)
- [CLSI] 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 474 M100 -S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Camarena, J., y Sanchez, R. (1998). Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Rev. SEIMC–Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 58(6), 598–607.
- Calla E. L. (2018). Estudio químico del extracto metanólico del liquen *Stereocaulon glareosum* (Sav.) H. Magn. (Tesis de maestría). Pontifica Universidad Católica del Perú. Lima, Perú.
- Calderón, G., y Aguilar, L. (2016). Infectología Resistencia Antimicrobiana : Microorganismos

- Más Resistentes Y Antibióticos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII*, (621), 757–763.
- Castro, O. N. (2004). Estudio fitoquímico del liquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale (Tesis de maestría). Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú.
- Castro, O. N. (2010). Aislamiento del ácido úsnico de *flavoparmelia caperata* y su determinación cuantitativa por espectroscopía UV, en diez líquenes. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 76(4), 389–399.
- Castro, O., Chávez, J., Santiago, J., y López, M. (2017). Preparación y caracterización de una crema fotoprotectora solar a base de nanopartículas quitosano con ácido úsnico. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 18(2), 60–76.
- Castro, O. N. (2016). Investigación fitoquímica de los líquenes: Química de los líquenes. Editorial académica española.
- Carmona, E., Sandoval, S., y García, C. (2012). Frecuencia y susceptibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus* proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29(2), 206–211. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2012.292.342>
- Cervantes, E., García, R., y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28–40. <https://doi.org/10.1108/eb020168>.
- Cóndor, E. (2012). Estudio Químico de los líquenes *Xanthoparmelia tasmanica* y *Xanthomendoza mendozae* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Ingeniería Lima, Perú.
- Contreras, A., Ángeles, J., Suárez, L., y Flores, J. (2014). Determinación del espesor óptico de aerosol en la estación antártica peruana Machu Picchu. *Ciencia y Desarrollo*, 17 (1), 11-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.21503/CienciayDesarrollo.2014.v17i1.02>.

- Corzo, D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(3), 81–86.
- Czeczuga B. y Alstrup V. (1987). The carotenoid content of lichens from Greenland. *Biochemical System Ecology*, 15(3), 297-301.
- Dieu, A., Mambu, L., Champavier, Y., Chaleix, V., Sol, V., Gloaguen, V., y Millot, M. (2019). Antibacterial activity of the lichens *Usnea Florida* and *Flavoparmelia caperata* (Parmeliaceae). *Natural Product Research*, 34(18), 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1561678>
- [EUCAST] 2019. Clinical Breakpoint Tables v.9.0. European National Breakpoint Committees.
- Flores, G. A. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Pleurotus ostreatus* ante cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- García, E., Alvarez, G., Londoño, P., y Sanchez, C. (2017). Estimación de la actividad antioxidante in vitro de los líquenes polares de la isla Rey Jorge – Antártida. *Visiones sobre Ciencia Antártica* | IX Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica, 378–381.
- García, E., Londoño, P., Sanchez, C, Marroquín D. (2017). Efecto citoprotector de los extractos de líquenes antárticos en células renales enfrentadas a *Gentamicina*. *Visiones sobre Ciencia Antártica* | IX Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica, 382–385.
- Gonsález, S. (2007). Los líquenes: Ecología y utilidad. Curso avanzado en Bioquímica del Suelo. La naturaleza de los aportes naturales. Un universo invisible bajo nuestros pies. Madrid, España. Recuperado de <https://www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/03/12/60989>.
- González A. G., Rodríguez Pérez E.M., Hernández Padrón C.E y Bermejo Barrera J.B (1992). Chemical Constituents of the Lichen *Stereocaulon azureum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 47 (7-8):503–507. <https://doi.org/10.1515/znc-1992-7-802>.
- González Mendoza, J., Maguiña Vargas, C., y González Ponce, F. de M. (2019). La resistencia a

- los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Medica Peruana*, 36(2), 145–151.  
<https://doi.org/10.35663/amp.2019.362.816>.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1990). El Reino de los Hongos. Fondo de Cultura Económica.
- Hatjimanoli, M., Favre-Bonvin, J., Kaouadji, M., y Mariotte, A. M. (1988). Monohydroxy- and 2,5-dihydroxy terephthalic acids, two unusual phenolics isolated from *Centaurium erythraea* and identified in other *Gentianaceae* Members. *Journal of natural products*, 51(5), 977–980.  
<https://doi.org/10.1021/np50059a030>
- Huneck, S. y Yoshimura, I. (1996). Identification of the lichen substances. Springer.
- Jiménez, C. (2013). El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 109(2), 134–141.
- [INS] 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas N° 30,
- Kim, S., Park, S., Min, T., y Yu, K. (1999). Antioxidant activity of ergosterol peroxide (5,8-Epidioxy-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergosta-6,22E-dien-3 $\beta$ -ol) in *Armillariella mellea*. *Bull. Korean Chemical Society*, 20(7), 819–823.
- Lindmeier C. (2018). Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. Organización Mundial de la salud.  
<https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>
- Lock de Ugaz, O., (1994). Investigación Fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales. 2a Edición. Fondo Editorial.
- Lock de Ugaz, O. (1998). Avances en el estudio del género *Werneria* y sus metabolitos secundarios. *Revista de Química*, 12(1), 69–85.
- Lobato C. (2013). Evaluación in vitro de la actividad de derivados de ergosterol y colesterol contra *Trypanosoma cruzi* (Tesis doctoral). Universidad Veracruzana. Veracruz, México.

- Londoño, P., Sanchez, C., y García, E (2017). Actividad antibacteriana de extractos acetona-metanólicos de líquenes antárticos. *Visiones sobre Ciencia Antártica | IX Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica*, 518–522.
- Londoño, P., García, E., y Sanchez, C. (2017). Estimación de la actividad anti-inflamatoria de extractos de líquenes antárticos mediante la prueba de la estabilidad de la membrana celular en glóbulos rojos. *Visiones sobre Ciencia Antártica | IX Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica*, 514–517.
- Londoño, P., Sánchez, C., y Alvarez, G. (2019). In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of methanol-acetone extracts from Antarctic lichens (*Usnea antarctica* and *Usnea aurantiaco-atra*). *Polar Science*, 22, Art.100477, <https://doi.org/10.1016/j.polar.2019.08.003>
- Martínez, M., Mantilla, L. E., Toro, D. R., y Galvis, J. H. (2016). Perfil químico y actividad antibacterial de los extractos de *Peltigera laciniata* (Merrill ex Riddle) Gyeln. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1–10.
- Molina, M. C. (2014). La Marea: Líquenes y sus aplicaciones en el ser humano. España. <https://www.lamarea.com/2014/09/29/los-liquenes-y-sus-aplicaciones-para-el-ser-humano/>.
- Morales, M. (2019). Efecto de la administración de peróxido de ergosterol en combinación con dosis subóptimas de nifurtimox sobre la parasitemia inducida por *Trypanosoma cruzi* en ratón. (Tesis doctoral). Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Nowak, R., Drozd, M., Mendyk, E., Lemieszek, M., Krakowiak, O., Kisiel, W., Rzeski, W. y Szewczyk, K. (2016). A new method for the isolation of ergosterol and peroxyergosterol as active compounds of *hygrophoropsis aurantiaca* and in vitro antiproliferative activity of isolated ergosterol peroxide. *Molecules*, 21(7), 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules21070946>
- Núñez A. y Vela Z. (2008) Inventario de hongos y líquenes de InkaTerra Hotel – Cusco. UPCH <https://www.inkaterra.com/inkaterra-asociacion-org/wp-content/uploads/2013/12/Informe-Final-Liquenes-MAPI.pdf>



- Oskay, M., Oskay, D., Kalyoncu, F. (2009). Activity of some plant extract against multi-drug resistant human pathogens. *Iranian Journal of pharmaceutical Research*, 8(4): 293-300.
- Pérez-Ortega, S., Ortiz-Álvarez, R., Allan Green, T. G., y De los Ríos, A. (2012). Lichen myco- and photobiont diversity and their relationships at the edge of life (McMurdo Dry Valleys, Antarctica). *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2), 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01422.x>
- Perico Franco, L. S. (2011). Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (Stereocaulaceae) y *Lobariella pallida* (Lobariaceae) y determinación de su potencial citotoxicidad (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia <http://www.bdigital.unal.edu.co/10563/>
- Piñeiro, V., Eguren, G., Pereira, I., y Zaldúa, N. (2012). Líquenes del entorno de la base científica Antártica Artigas, Bahía Collins, Isla Rey Jorge, Antártida: Estudio preliminar. *Polibotánica*, (33), 105–116.
- Qilhot, M., Hidalgo E., Fernández E., Peña Wenceslao y Flores E. (1992). Posible rol biológico de metabolitos secundarios en líquenes antárticos. *ResearchGate*, 42(0), 53-59.
- Robles, J., Morales, P., y Pastor de Abram, A. (1992). Líquenes y sustancias liquénicas. *Revista de Química*, 6(1), 65–76.
- Rodríguez A., O. E., Andrade B., W. A., Díaz L., F. E., y Moncada, B. (2015). Actividad antimicrobiana de líquenes de la cuenca alta del río Bogotá. *Nova*, 13(23), 65. <https://doi.org/10.22490/24629448.1706>.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., y García J. (2005). Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Seo C, Sohn JH, Park SM, Yim JH, Lee HK y Oh H (2008). Usimines A-C bioactive usnic acid derivatives from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *Journal of Natural Products*, 71(4), 710-712. DOI: 10.1021/np070464b

- Tamariz, J., Horna, G., Tapia, E., Vicente, W., Silva, M., Zerpa, R., y Guerra, H. (2010). *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. *Revista Medica Herediana*, 21(1), 4–10. <https://doi.org/10.20453/rmh.v21i1.1139>
- Vaillant, D. (2014). Los líquenes, una alternativa para el control de fitopatógenos Daymara. *Fitosanidad*, 18(1), 51–57.
- Valgas, C., Machado de Souza, S., Smânia, E., Smânia, A. Jr. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products (2007). *Brazilian Journal of Microbiology* 38(1), 369-380.
- Vega, M. J. (2016). Caracterización de las actividades biológicas del liquen antártico *Usnea aurantiaco-atra* (Tesis doctoral). Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Valencia, España.
- Viteri, R. (2015). Estudio fitoquímico del extracto etanólico del liquen *Usnea antarctica*, procedente de la Antártida (Tesis de maestría). Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Venezuela. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2013.0625>
- Viteri, R., Salazar, F., y Villamizar, J. E. (2016). *Metabolitos secundarios aislados del liquen Usnea antarctica*. En E. Pereira (Presidencia), 32° Congreso Latinoamericano de Química. Congreso llevado a cabo en Concepción, Chile.
- Wirtz, N., Printzen, C., Sancho, L., y Lumbsch, T. (2006). The phylogeny and classification of *Neuropogon* and *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota). *Taxón*, 55(2), 367–376.
- Zelada, B. R., y Pastor De Abram, A. (2012). Estudio fitoquímico de *Usnea durietzii* MOT. (usneaceae). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 78(4), 264–276.

## CAPÍTULO VII: ANEXOS

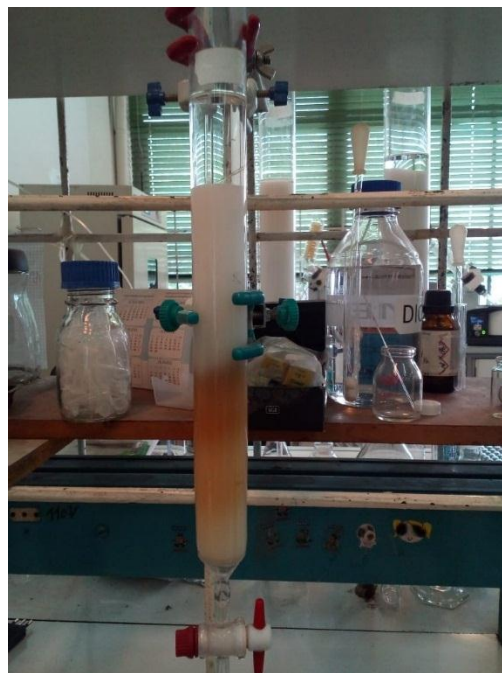
### Anexo 1. Técnicas de extracción sólido - líquido



a. Extracción por solvente



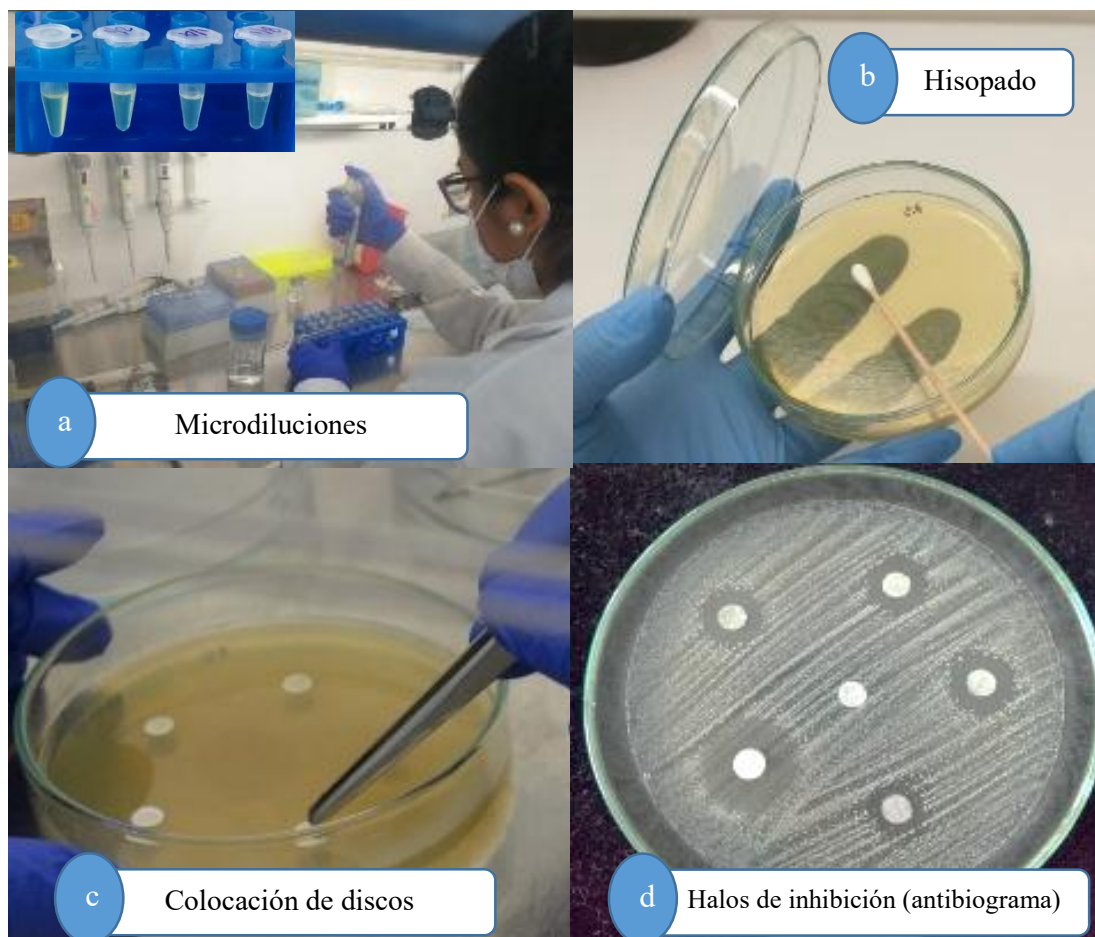
b. Separación por CC con Sílica



c. Separación por CC con Sephadex.

Fuente: Elaboración propia.

### Anexo 2. Evaluación de la actividad antibacteriana.



Fuente: Elaboración propia.

### Anexo 3. Puntos de corte de los discos de antibióticos empleados como control positivo.

Cepa bacteriana	Disco de antibiótico	CLSI (mm)	EUCAST (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Cloranfenicol 30 µg	19-26	20-28
	Doxiciclina 30 µg	23-29	-
	Trimetoprima 5 µg	19-26	22-28

Fuente: Puntos de corte según el CLSI 2017 y la EUCAST 2019.